Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

BEGRÜNDET VON **W. RUHLAND** UND **H. WINKLER**

UNTER MITWIRKUNG VON
J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK,
R. HARDER-GÖTTINGEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

L. BRAUNER
MÜNCHEN

E. BÜNNING
TÜBINGEN

56. BAND, 2. HEFT
MIT 75 TEXTABBILDUNGEN
(ABGESCHLOSSEN AM 10. JANUAR 1961)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1961

Planta (Berl.)

Preis DM 26.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E.) Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*. Band 48—51. Herausgegeben von *W. Ruhland*, *L. Brauner* und *E. Bünning*

Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Die eingereichten Arbeiten sollen 2 Druckbogen (à 16 Druckseiten) in der Regel nicht überschreiten.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an
Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Institut der Universität,
oder an
Professor Dr. Erwin Bünning, Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelmstraße 5.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301, Fernschreibnummer 01-83 319
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61 723

56. Band — **Inhaltsverzeichnis** — 2. Heft

Seite

Ross, H., Viscosität und Permeabilität des Plasmas von *Lamium maculatum* bei Dürre-, Temperatur- und Schütteleffekten. Mit 13 Textabbildungen 125

Köhler, D., Ein Beitrag zur Physiologie und Genetik der Geschlechtsausprägung von *Cannabis sativa*. Mit 15 Textabbildungen 150

Haccius, B., und D. Massfeller, Untersuchungen zur biologischen Aktivität der Phenylborsäure. Mit 9 Textabbildungen 174

Lüttge, U., Über die Zusammensetzung des Nektars und den Mechanismus seiner Sekretion. I. Mit 5 Textabbildungen 189

Drawert, H., und I. Metzner-Küster, Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. I. Mitteilung. Zellwand- und Gallertstrukturen bei einigen Arten. Mit 32 Textabbildungen 213

Hess, D., Ribosenucleinsäure und Blühinduktion. Kurze Mitteilung 229

Jürgensmeier, H.-L., Über das Zusammenwirken verschiedener Faktoren bei der Anthocyanentfärbung von Begonien. Kurze Mitteilung. Mit 1 Textabbildung 233

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Planta 56, 125—149 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Darmstadt

VISCOSITÄT UND PERMEABILITÄT DES PLASMAS VON *LAMIUM MACULATUM* BEI DÜRRE-, TEMPERATUR- UND SCHÜTTELEFFEKTEN

Von

HELGA ROSS

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. September 1960)

A. Einleitung und Problemstellung

STOCKER[1] (1956a, b) vertritt die Theorie, daß Dürre- und Schütteleffekte in 2 Phasen ablaufen, die er als *Reaktions-* und *Restitutionsphase* bezeichnet. In der ersteren erfolgt eine strukturelle Lockerung des Plasmas und damit verbunden eine Herabsetzung der Viscosität sowie eine Erhöhung der Porenpermeabilität. In der Restitutionsphase wird die Reaktion überwunden, das Plasma wieder fester geknüpft und entsprechend die Viscosität erhöht und die Porenpermeabilität herabgesetzt. Dabei können die Restitutionsvorgänge über den Anfangszustand der Pflanzen hinausgehen und zu einer als Abhärtung bezeichneten Überkompensation der Reaktion führen. Die Theorie wird bestritten von LEVITT (1956), der die Vorstellung einer Plasmaverflüssigung als „Dürrereaktion" ablehnt und ganz allgemein eine lockerere Verknüpfung der Plasmafibrillen im resistenten Zustand als im nichtresistenten erwartet. Da eine Klärung der Verhältnisse nötig ist, haben wir uns die Aufgabe gestellt, die Änderungen der Viscosität und Permeabilität des Plasmas während der *gesamten Austrocknungszeit* zu verfolgen, um so gegebenenfalls auch einen in Reaktions- und Restitutionsphase gegliederten Verlauf zu erfassen. Dabei soll der mögliche Einfluß eines Temperaturwechsels berücksichtigt werden. Da die Viscositäts- und Permeabilitätsmessungen eine Bestimmung des osmotischen Werts voraussetzen, wollen wir am Rande dieser Arbeit einige Betrachtungen über sein Verhalten bei den verschiedenen, auf die Pflanzen ausgeübten Reizen anstellen.

B. Kultur und Probennahme

Wir wählten das gleiche Versuchsobjekt wie zuvor in unserem Institut SCHMIDT (STOCKER 1956b): *Lamium maculatum*.

Die *Versuchspflanzen* gehörten einem Klon an, der durch Stecklingsvermehrung aus einer Wildpflanze im Botanischen Garten gewonnen worden war. Sie wurden

[1] Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. O. STOCKER, danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, sowie für das Interesse, das er ihr stets entgegengebracht hat.

auf Komposterde im Freien kultiviert, wenn nicht anders angegeben in 400 cm^3-Bechergläsern. Die *Versuche* wurden in 2 Klimaräumen durchgeführt, deren Lufttemperatur und -feuchtigkeit in verschiedenen Kombinationen reguliert werden konnten. Von 6^{00}—20^{00} Uhr täglich brannten elektrische Leuchtstoffröhren über den Pflanzen; die Lichtintensität betrug an den Pflanzen durchschnittlich 5000 Lux. Während der übrigen Stunden herrschte Dunkelheit. Die 4—8 Wochen alten Pflanzen wurden zur Eingewöhnung mindestens 2 Tage vor Versuchsbeginn den klimatischen Arbeitsbedingungen ausgesetzt. Die feucht bzw. trocken kultivierten Pflanzen bezeichnen wir abgekürzt als F.- bzw. T.-Pflanzen.

Die *plasmatischen Messungen* wurden an Zellen der Stengelhypodermis vorgenommen. Mit einer Rasierklinge in Quadrate von 2—3 mm Seitenlänge eingeteilt, ließen sich Epidermis und Hypodermis leicht mit einer Pinzette vom Stengel abziehen. Zellen, die unmittelbar an Schnittränder grenzten, wurden nicht benutzt. Zur Vermeidung von Änderungen des Plasmazustandes wurden die Schnitte ohne vorheriges Wässern verwendet. Vergleichende Untersuchungen wurden an gleichen Internodien von Pflanzenstengeln gleichen Alters durchgeführt.

C. Viscosität und osmotischer Wert

I. Methodik

Die *Viscosität* des Plasmas wurde nach der *Plasmolysezeitmethode* (BEYSEL 1957) gemessen. Als Plasmolysezeit bezeichnen wir die Zeit, in der 50% der beobachteten Zellen — in der Regel wurden an einem Schnitt 30 Zellen ausgezählt — Perfektplasmolyse erreicht haben. Sie wurde an jeder Versuchspflanze 1—2mal bestimmt. Die Konzentrationen der Plasmolytika wurden nach den *osmotischen Werten* der zu vergleichenden Zellen eingestellt, und zwar wurde mit einer Rohrzuckerlösung gearbeitet, die stets um 0,15—0,2 G. M. höher konzentriert war als der osmotische Wert.

Den Grund für eine Verlängerung der Plasmolysezeit bei Konzentrationserhöhung des Plasmolytikums sehen wir vor allem in der Diffusionsbegrenzung bei steigendem Durchtritt von Wassermolekülen durch das Plasma und in der Verkleinerung der Plasmaoberfläche mit Zunahme des Plasmolysegrades. Deshalb halten wir es für nötig, daß die zu vergleichenden Cytoplasten annähernd gleiche Endplasmolysegrade erlangen. Wird die Plasmolysezeitmethode unter Benutzung gleicher Konzentrationen des Plasmolytikums angewendet, wie es LEVITT und SIMINOVITCH fordern (STOCKER 1956b, S. 700), so muß nach unserem Dafürhalten eine Zelle mit tieferem osmotischem Wert einen höheren Plasmolysegrad und längere Plasmolysezeit aufweisen als eine andere mit gleicher Plasmaviscosität aber höherem osmotischem Wert, da ihr Konzentrationsgefälle größer ist. Auf diese Weise kann irrtümlich auf einen Unterschied in der Viscosität der beiden verglichenen Protoplasten geschlossen werden.

Die plasmatische Größe, welche die Dauer der *Plasmolysezeit* bestimmt, darf nur mit Vorbehalt als „*Viscosität*" bezeichnet werden. Wahrscheinlich ist sie im wesentlichen Strukturviscosität. Es können aber auch andere Faktoren, eventuell auch die Adhäsion des Plasmas an der Zellwand, beteiligt sein.

Die *Plasmolyseformmethode* (BEYSEL 1957) war für unsere Zwecke nicht geeignet. Auch auf die Anwendung der *Zentrifugenmethode* (BEYSEL 1957) mußte verzichtet werden. Die Schleuderbewegungen verursachten eine Abnahme der Viscosität, die ungefähr ebenso groß war wie bei Schüttelbewegungen. Wir stellten an

F.-Pflanzen eine Verkürzung der Plasmolysezeiten von 20,0 ± 0,4 auf 9,1 ± 0,4 min, an T.-Pflanzen von 72,5 ± 0,7 auf 27,7 ± 0,5 min fest (Ross 1955). War die Viscosität jedoch schon durch einen Schütteleffekt erniedrigt, so blieb sie beim Schleudern nahezu unverändert. Vermutlich läuft die reversible Plasmaverflüssigung auf einen Grenzwert hinaus, der auch bei einer zusätzlichen mechanischen Reizung nicht überschritten wird. Nach der Zentrifugenmethode konnten also zwar, allerdings durch das Zentrifugieren beeinflußte Viscositätsunterschiede zwischen F.- und T.-Pflanzen ermittelt werden, es war jedoch nicht möglich, einen nach der Plasmolysezeitmethode gemessenen Schütteleffekt auch nach der Zentrifugenmethode zu erfassen. Vermutlich ist auch die Ursache der durch die Schleuderung bewirkten Viscositätsabnahme des Cytoplasmas in einer Lösung von Haftpunkten des Molekularnetzes zu suchen.

Es ist beobachtet worden (Stålfelt 1955), daß Licht Viscositätsschwankungen auslöst, die sich um einen Mittelwert bewegen und erst 2—3 Tage nach dem Ausschalten des Lichts aufhören. Für unser Objekt haben orientierende Versuche bei konstanten Temperatur- und Feuchteverhältnissen ergeben, daß die mittleren Plasmolysezeiten einer Pflanzenreihe zu verschiedenen Tageszeiten nahezu gleich lang sind; in den mittleren Plasmolysezeiten, auf welche im folgenden unsere Betrachtungen gestützt sind, treten also die oben erwähnten Viscositätsschwankungen nicht zutage.

Der *osmotische Wert* wurde nach der plasmometrischen Methode von Höfler (Beysel 1957) aus dem Plasmolysegrad berechnet. Als Plasmolytikum diente Rohrzuckerlösung, deren Konzentration so gewählt wurde, daß der Plasmolysegrad etwa 0,7 betrug. Die Messung erfolgte stets an 12 in der Mitte der Schnitte gelegenen Zellen. Die mittleren osmotischen Werte der einzelnen Pflanzen, die sich daraus ergaben, besaßen ungefähr gleiche Genauigkeit (Abweichung ± 1,5%).

Die hohen Temperaturen und Luftfeuchten der Klimaräume erschwerten oft die mikroskopische Untersuchung der Präparate in ihnen. Mit Ausnahme einiger Versuche mit anhaltendem Schütteln (8 bzw. 33 Tage; Abb. 7) wurden deshalb sämtliche Messungen in einem den Klimakammern benachbarten Raum durchgeführt, dessen Temperatur 15°—20° C betrug. Die Versuchstemperaturen lagen gewöhnlich höher. Das dürfte aber die Ergebnisse nicht wesentlich beeinträchtigt haben, denn die Perfektplasmolyse wurde bei sämtlichen Messungen spätestens nach 1,5 Std, meistens aber viel früher erreicht, und die Viscosität begann erst ungefähr 10 Std nach der Temperatursenkung sich merklich zu ändern (Abb. 5).

II. Änderung des Bodenwassergehaltes bei gleichbleibender Temperatur

a) Die Austrocknungs(Reaktions)phase. Wir betrachten zunächst die Vorgänge vom Beginn der Austrocknung bis zur Stabilisierung des Bodenwassergehaltes auf einem erniedrigten Niveau, d. h. den Teil des Düreeffektes, der im wesentlichen die *Reaktionsphase* im Sinne Stockers ausmacht. In unseren Versuchen ließen wir den Boden vom Zustand optimalen Wassergehaltes (100% bzw. 90% der Wasserkapazität) mit verschiedenen Geschwindigkeiten bis zu einem Dürregrad austrocknen, der für die Pflanze noch erträglich war und einem Wassergehalt von 22—25% der Kapazität entsprach. Dabei war die Wasserverteilung in der Topferde wahrscheinlich ungleichmäßig, und der Betrag von 22 bis 25% stellt nur einen Durchschnittswert von mehr und weniger ausgetrockneten Bodenpartien dar (S. 131).

Eine sehr „*schnelle*" *Austrocknung* wurde erreicht, wenn der Versuch in der Klimakammer bei 36° C und 40—45% relativer Luftfeuchtigkeit durchgeführt wurde. Der Bodenwassergehalt der Kulturgefäße sank dann innerhalb von 26 Std von 100% auf 22% der Wasserkapazität ab; niedrigere Feuchtigkeiten waren letal. Es ist bekannt, daß der *osmotische Wert* bei Austrocknung des Bodens ansteigt (SIMONIS 1952)[1]. Er erhöhte sich in unserem Fall von 0,450 auf 0,542 G. M. Rohrzucker (Abb. 1).

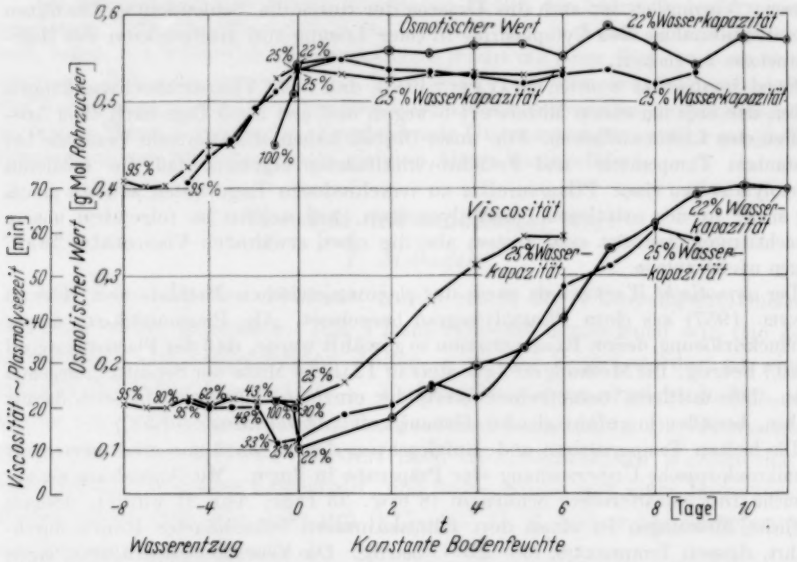


Abb. 1. Schnelle, mittelschnelle und langsame Bodenaustrocknung. Viscosität und osmotischer Wert der Versuchspflanzen beim Übergang von Feucht- zur Trockenkultur. Konstante Raumtemperatur. ●—● schnelle Austrocknung (Raumtemperatur 36° C); ●—● mittelschnelle Austrocknung (Raumtemperatur 35° C); ×—× langsame Austrocknung (Raumtemperatur 35° C)

Die *Viscosität* sank während der *schnellen Austrocknung* (Abb. 1) von $21 \pm 0{,}5$ auf $10{,}1 \pm 0{,}5$ min Plasmolysezeit ab. Die Verminderung erfolgte nicht kontinuierlich sondern sprunghaft unterhalb von 30% der Wasserkapazität. Bei der Annahme, daß im wesentlichen die Strukturviscosität gemessen wird, liegt die Vorstellung nahe, daß beim Absinken des Wassergehaltes wachsende Spannungen im Eiweißgerüst entstehen, die dann schließlich in Zerreißungen zur Auslösung kommen.

Eine „*mittelschnelle*" *bis* „*langsame*" *Erdaustrocknung* erreicht man unter ähnlichen Bedingungen in der Klimakammer, wenn man größere

[1] LAISNÉ (1939) und SLAVIK (1955) beobachteten an welkenden abgeschnittenen Blättern Veränderungen des osmotischen Wertes, welche an die von STOCKER in Reaktions- und Restitutionsphase gegliederten Dürreeffekte erinnern. Nach raschem Anstieg fiel der osmotische Wert plötzlich stark ab und stieg dann wieder an. Die Angaben wurden von WALTER und SCHALL (1957) geprüft, aber nicht bestätigt.

Versuchsgefäße (800 cm³-Bechergläser) verwendet und nötigenfalls in bestimmten Zeitabständen geringe Wassermengen zugibt. Unter diesen Bedingungen erfolgt ebenfalls eine Viscositätsabnahme, wenn der für die Pflanze noch erträgliche Austrocknungsgrad der Erde von 22—25% der Wasserkapazität innerhalb von 5 Tagen erreicht wird, bei langsamerem Austrocknen aber nicht mehr.

Bei „*mittelschnellem*" *Austrocknen* tritt der Abfall der Viscosität schon zu einer Zeit ein, zu der der Bodenwassergehalt erst auf 48—33% der Wasserkapazität gesunken ist, unterscheidet sich aber größenmäßig nicht von dem bei „schneller" Austrocknung; auch hier wird der normale Betrag auf etwa die Hälfte herabgesetzt. Abb. 1 zeigt die täglichen Werte des osmotischen Druckes und der Viscosität für eine 5 Tage währende Bodenaustrocknung, bei welcher der Wassergehalt von 95% auf 25% der Wasserkapazität vermindert worden ist. Am 4. Tag, bei 33% der Wasserkapazität, ergibt sich für die Viscosität nur noch eine Plasmolysezeit von $11{,}4 \pm 1{,}2$ min gegenüber einer solchen von $21 \pm 1{,}0$ min bei 95% der Bodenwasserkapazität.

Bei „*langsamer*" *Bodenaustrocknung* über 6 Tage — untersucht wurde bis zu 10 Tagen — läßt sich keine Viscositätsabnahme mehr feststellen; der normale Wert bleibt während der Bodenaustrocknung unverändert. Aus Abb. 1 können die täglichen Werte des osmotischen Druckes und der Viscosität für eine 8 Tage währende Bodenaustrocknung entnommen werden, bei welcher der Bodenwassergehalt von 95% auf 25% der Wasserkapazität herabgesetzt worden ist.

Zusammenfassend ergibt sich für die Reaktionsphase, daß der *osmotische Wert*, unabhängig von der Dauer der Austrocknung, gleichmäßig bis zu einem Betrag ansteigt, der durch den Wassergehalt des Bodens bestimmt ist. Die *Viscosität* dagegen folgt komplizierteren Zusammenhängen, und ihr Verhalten ist abhängig von der Geschwindigkeit der Austrocknung: bei schneller Austrocknung, innerhalb von 1—5 Tagen, tritt eine starke Erniedrigung der Viscosität auf etwa die Hälfte ihres Ausgangswertes ein, bei längerer Dauer des Austrocknungsprozesses dagegen ist ein solcher Vorgang nicht zu beobachten. Eine Erklärung dieser verschiedenen Verhaltensweisen ist am einfachsten durch die Annahme zu gewinnen, daß von Anfang an Restitutionsvorgänge der Dürrereaktion entgegenwirken. Erfolgt die Austrocknung schnell, so hat die Restitution nicht genügend Zeit, den der Viscositätserniedrigung zugrunde liegenden Strukturzusammenbruch zu verhindern. Der Viscositätsabfall ist dann als plötzliche Lösung von im Eiweißgerüst entstandenen Spannungen aufzufassen. Auch dieser Spannungsausgleich ist vielleicht zeitabhängig und benötigt eine gewisse Entwicklungszeit. Sein Eintritt ist bei schneller Austrocknung „verzögert", d. h. er tritt erst bei niedrigeren Bodenfeuchten ein als bei langsamer

Austrocknung; im ersten Fall ist der Zusammenbruch erst unterhalb von 30% der gemessenen Wasserkapazität erfolgt, im zweiten schon oberhalb von 33%. Diese Zahlen erlauben aber keine sichere Aussage, weil die Wasserverteilung in den Versuchsgefäßen offenbar nicht gleichmäßig gewesen ist. Ebenfalls nicht sicher zu entscheiden ist die Frage, ob ein Einfluß einer früh einsetzenden Restitution auch schon bei „mittelschneller" Austrocknung vorhanden ist. Das erscheint durchaus wahrscheinlich, und die Kurvengänge in Abb. 1 sprechen dafür, wenn auch die Zahlen nicht als gesichert angesehen werden können: Bei der „mittelschnellen" Austrocknung ist die Viscosität im Stabilisierungszeitpunkt 0 bei 25% der Wasserkapazität bereits wieder etwas höher als einen Tag früher in der Austrocknungsperiode bei 33%.

b) Die Trocken(Restitutions)phase. Wir verfolgen nun, was geschieht, wenn wir nach einer für die Pflanze noch ertragbaren Austrocknung den erreichten Trockenheitsgrad des Bodens konstant halten.

In dieser von den *Restitutionsvorgängen* beherrschten *Trockenperiode* zeigt der *osmotische Wert* keine Änderungen (Abb. 1). Wahrscheinlich ist seine Heraufsetzung in der Austrocknungsphase und die Beibehaltung dieses Wertes in der Trockenphase nicht nur eine Folge des verminderten Wassergehaltes sondern auch einer Neubildung osmotischer Substanz in der Reaktionsphase (STOCKER 1956b).

Anders verhält sich die *Viscosität*. Sie beginnt anzusteigen, erreicht das 3—$3^1/_2$fache des Betrages der F.-Pflanzen und bleibt dann auf diesem hohen Wert stehen (Abb. 1). Nach der schnellen und mittelschnellen Austrocknung gewinnt sie ihre in der Reaktionsphase verlorene Ausgangshöhe in rund 2 Tagen zurück. Der weitere Abhärtungsanstieg vollzieht sich innerhalb von weiteren 6—7 Tagen. Nach einer langsamen Austrocknung brauchen die Haftpunktbindungen des Plasmas nicht neu hergestellt zu werden, so daß die Abhärtung sofort nach Einstellen des Wasserentzuges einsetzen kann. Sie nimmt in unserem Versuch (Abb. 1) 5 Tage in Anspruch. Wahrscheinlich ist die Stabilisierung durch eine stärkere Hydratisierung an bestimmten Haftstellen bedingt. Nach BOGEN (Hitzeresistenz) braucht damit nicht notwendig eine allgemeine Erhöhung der Hydratation (bound water) verbunden zu sein. Es gibt aber jetzt viele Angaben, die eine solche allgemeine Zunahme des „gebundenen Wassers" wahrscheinlich machen (z. B. LEVITT, HENCKEL usw.).

Daß an gleichem Versuchsmaterial nach mittelschneller und langsamer Austrocknung des Bodens[1] gleiche Viscositätshöhe festzustellen

[1] Die Meßwerte für die schnelle Austrocknung beziehen sich auf eine andere Pflanzenreihe mit etwas anderen Versuchsbedingungen (Bodenaustrocknung von 100% auf 22% der Wasserkapazität in 400-ccm-Bechergläsern bei 36°C und 40 bis 45% relativer Luftfeuchte gegenüber der mittelschnellen und langsamen Austrocknung von 95% auf 25% der Wasserkapazität in 800-ccm-Bechergläsern bei 35°C und 60—70% relativer Luftfeuchte.

ist, kann als Hinweis darauf angesehen werden, daß die endgültige Viscositätshöhe der T.-Pflanzen unabhängig von der Geschwindigkeit der Bodenaustrocknung ist und nur durch den Austrocknungsgrad der Pflanzen bestimmt wird, der wiederum von der Trockenheit des Bodens und der Luft abhängt.

c) Der Temperaturfaktor. Um die Bedeutung des *Temperaturfaktors* für das Verhalten der Plasmaviscosität beim Dürreprozeß zu klären,

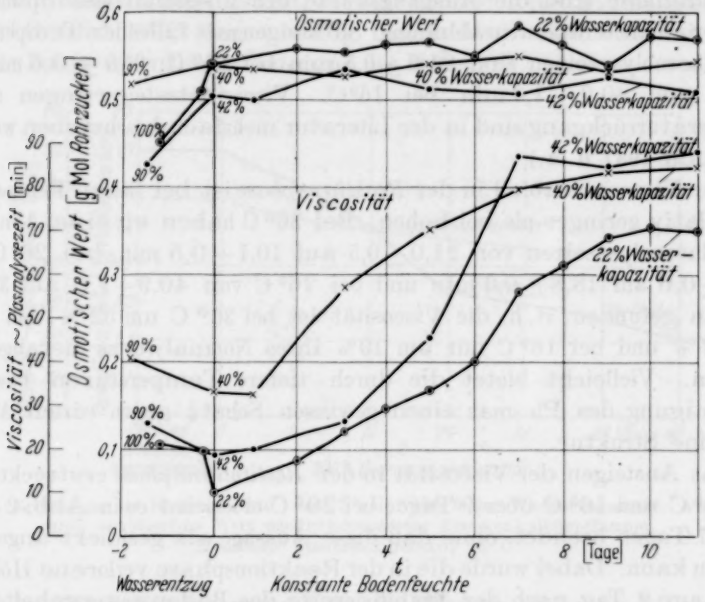


Abb. 2. Schnelle Bodenaustrocknung. Viscosität und osmotischer Wert der Versuchspflanzen beim Übergang von Feucht- zur Trockenkultur. Konstante Raumtemperatur. ●——● Raumtemperatur 36° C; ●——● Raumtemperatur 26° C; ×——× Raumtemperatur 16° C

wurden weitere Versuchsreihen bei Raumtemperaturen von 26° C und 16° C angesetzt (Abb. 2).

Als Kulturgefäße wurden jetzt durchlöcherte Papptöpfe von etwa 250 cm³ Inhalt verwendet. Sie haben den Vorteil, auch bei dem geringeren Wasserumsatz bei niedrigeren Temperaturen eine schnelle Austrocknung des Bodens zu erlauben. Der Welkungspunkt der Pflanzen lag in ihnen höher als in den gewöhnlich verwendeten 400 cm³-Bechergläsern, bei etwa 38% der Bodenwasserkapazität. Das rührt vermutlich mit daher, daß die Erde gleichmäßiger austrocknet als in den größeren, nicht durchbrochenen Gläsern, in welchen bei ungleicher Wasserverteilung sich unten Wasserreserven erhalten dürften. Die Austrocknung des Bodens mußte daher schon bei 42% bzw. 40% der Bodenwasserkapazität eingestellt werden.

Qualitativ verlaufen die Reaktions- und Restitutionsvorgänge bei 16° und 26° ebenso wie bei der höheren Temperatur von 36° C (Abb. 1 u. 2). Bei schneller Austrocknung des Bodens (innerhalb von 33 Std bei 26° C,

von 43 Std bei 16° C) erfolgt ein Absinken der Viscosität; es ist, dem höheren Welkungspunkt entsprechend, schon bei 42% bzw. 40% der Bodenwasserkapazität beobachtet worden (Abb. 2). Bei langsamer Austrocknung (innerhalb von 6—7 Tagen) wird, wie orientierende Versuche gezeigt haben, der Viscositätsabfall durch die Restitutionsvorgänge verhindert. In der Trockenphase finden wir dann den Anstieg der Viscosität als Folge von Restitutionsvorgängen.

Quantitativ sind die Ausgangswerte der Viscosität bei optimalem Wassergehalt temperaturabhängig. Sie steigen mit fallender Temperatur; die Plasmolysezeiten sind $21{,}0 \pm 0{,}5$ min bei 36° C, $25{,}6 \pm 0{,}6$ min bei 26° C und $40{,}9 \pm 1{,}0$ min bei 16°C. Viscositätssteigerungen durch Temperaturrückgang sind in der Literatur mehrfach beschrieben worden (ULLRICH 1937 u. a.).

Der Viscositätsabfall in der *Reaktionsphase* ist bei tiefen Temperaturen relativ geringer als bei hohen. Bei 36° C haben wir eine Abnahme der Plasmolysezeiten von $21{,}0 \pm 0{,}5$ auf $10{,}1 \pm 0{,}5$ min, bei 26° C von $25{,}6 \pm 0{,}6$ auf $18{,}8 \pm 0{,}6$ min und bei 16° C von $40{,}9 \pm 1{,}0$ auf $33{,}1 \pm 1{,}0$ min gefunden, d. h. die Viscosität ist bei 36° C um 52%, bei 26° C um 27% und bei 16° C nur um 19% ihres Normalwertes herabgesetzt worden. Vielleicht bietet die durch tiefere Temperaturen bewirkte Verfestigung des Plasmas einen gewissen Schutz gegen einen Angriff auf seine Struktur.

Das Ansteigen der Viscosität in der *Restitutionsphase* erstreckte sich bei 36° C und 16° C über 9 Tage; bei 26° C erscheint es in Abb. 2 schon nach 7 Tagen beendet, ohne daß diese Aussage als gesichert angesehen werden kann. Dabei wurde die in der Reaktionsphase verlorene Höhe bei 16° C am 2. Tag nach der Stabilisierung des Bodenwassergehaltes auf 40% der Wasserkapazität, bei 26° C und 36° C am 3. Tage nach dem Konstanthalten des Bodenwassergehaltes auf 42% bzw. 22% der Wasserkapazität, wieder erreicht. Eine Beeinflussung der Restitutionsgeschwindigkeit durch die Temperatur ist also nicht zu erkennen.

Was die in der Restitutionsphase erreichte „*Abhärtung*" angeht, so betragen die Plasmolysezeiten der T.-Pflanzen bei 36° C rund 70 min, bei 26° C und 16° C rund 85 min. Die Abhärtungsviscosität ist also bei 36° C und 26° C 3,3mal, bei 16° C 2,1mal so groß wie die Ausgangsviscosität der F.-Pflanzen. Vielleicht ist mit einer Plasmolysezeit von 85 min eine obere Grenze der Viscosität erreicht worden, doch sind die Versuche zahlenmäßig zu gering, um daraus einen Schluß ziehen zu können.

Es muß noch darauf hingewiesen werden, daß die bei 36° C erzielten Ergebnisse mit den beiden Versuchen bei 26° C und 16° C nicht streng vergleichbar sind, da sie zu einem früheren Zeitpunkt und unter anderen Randbedingungen (feste Gefäße, stärkere durchschnittliche Bodenaustrocknung, höheres Sättigungsdefizit der Luft) gewonnen wurden. Das Sättigungsdefizit der Luft betrug bei 36° C und 45%

relativer Feuchte 24,4 mm Hg, bei 26° C und 60% relativer Feuchte 10,0 mm Hg und bei 16° C und 60% relativer Feuchte 5,4 mm Hg.

Die *osmotischen Werte* (Abb. 2) sind während des Wasserentzuges angestiegen, bei 36° C von 0,450 auf 0,542, also um 0,092 G. M. Rohrzucker oder um 20,4%, bei 26° C von 0,425 auf 0,505, also um 0,080 G. M. Rohrzucker oder um 18,8% und bei 16° C von 0,518 auf 0,539, also um 0,021 G. M. Rohrzucker oder um 4,0%. Der geringste Anstieg, bedingt durch den hohen Ausgangswert, ist also bei 16° C erfolgt, die Kulturen bei 26° C und 36° C zeigen wenig Unterschied. Die Schwankungen bringen keine wesentliche Änderung des Niveaus.

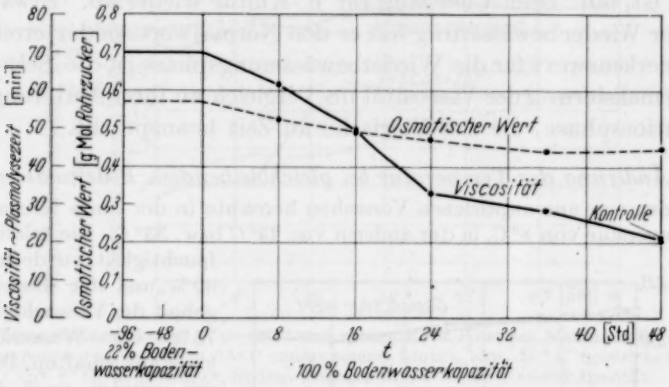


Abb. 3. Erhöhung der Bodenfeuchte von 22 % auf 100 % der Wasserkapazität. Viscosität und osmotischer Wert wiederbewässerter Trockenkulturpflanzen. Konstante Raumtemperatur 25° C

d) Die Wiederbewässerungsphase. T.-Pflanzen, die etwa 5 Tage lang ihre durch Abhärtung bei 36° C, 40—45% relativer Luftfeuchtigkeit und einem Bodenwassergehalt von 22% der Wasserkapazität erlangte Viscositätshöhe (Abb. 1) gehalten hatten, wurden wieder optimal befeuchtet, d. h. der Bodenwassergehalt wurde wieder auf 100% der Wasserkapazität gebracht. Es interessierte die Frage, ob und wie die Viscosität wieder absinken würde. Da bei Temperaturen von 32°—36° C eine plötzliche starke Zunahme der Bodenfeuchtigkeit ein Welken und Absterben der Blätter zur Folge hatte, dessen Ursache nicht untersucht wurde, und diese Komplikation eine allmähliche Steigerung des Wassergehaltes notwendig gemacht hätte, wurde die Raumtemperatur auf 25° C herabgesetzt und die Luftfeuchtigkeit auf 80% erhöht, um die Wiederbewässerung in einem Zug durchführen zu können.

Schon nach 8 Std beginnt eine Verkürzung der *Plasmolysezeiten* (Abb. 3). Nach ungefähr 48 Std ist die *Viscosität* auf den Ausgangswert normalisiert. Das bedeutet in unserer Auffassung, daß sich das plasmatische Eiweißgerüst wieder im ursprünglichen Strukturzustand

befindet. Die durch die Trockenheit verursachte plasmatische Strukturänderung ist danach kein pathologischer, irreversibler Effekt, sondern entspricht einer physiologischen Abhärtung der Pflanze gegen verschlechterte Wasserversorgung. Wie lange der Zustand verschlechterten Wasserzustandes dauern kann, bevor irreversible Schäden der plasmatischen Struktur eintreten, wie sie sich nach starken und langen Dürrewirkungen unter anderem in Störungen des Assimilations- und Atmungshaushaltes äußern (STOCKER 1956b), ist von uns bei *Lamium* nicht untersucht worden.

Auch der *osmotische Wert*, der unter trockenen Bedingungen angestiegen ist, fällt beim Übergang zur F.-Kultur wieder ab. Etwa 36 Std nach der Wiederbewässerung hat er den Normalwert wieder erreicht.

Bemerkenswert für die Wiederbewässerungsphase ist die *Schnelligkeit* der Normalisierung der Viscosität im Vergleich zu ihrer Änderung in der Restitutionsphase, die das Vierfache an Zeit beansprucht.

III. Änderung der Temperatur bei gleichbleibendem Bodenwassergehalt

Bei den von uns angesetzten Versuchen herrschte in der einen Klimakammer eine Temperatur von 8° C, in der anderen von 25° C bzw. 33° C. Die relative Luftfeuchtigkeit wurde bei jeweils 60% und der Bodenwassergehalt der Versuchsgläser bei 75% der Wasserkapazität konstant gehalten. Die Pflanzen wurden nach 4tägigem Aufenthalt in der einen Kammer in die andere übergeführt.

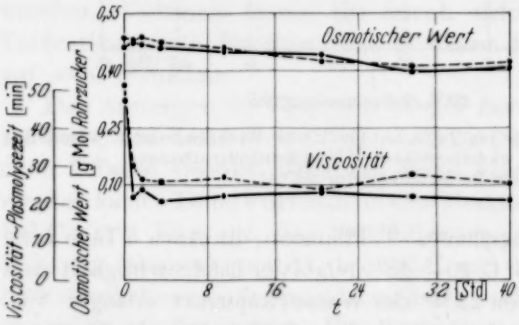


Abb. 4. Temperaturerhöhung. Viscosität und osmotischer Wert der Versuchspflanzen nach einem Temperaturwechsel von 8° auf 33° C (ausgezogene Linie) bzw. 25° C (gestrichelte Linie). Konstanter Bodenwassergehalt 75% der Wasserkapazität

Wir besprechen zuerst das Verhalten der Viscosität bei plötzlicher Erhöhung der Temperatur von 8° C auf 25° C und 33° C. Aus der Abb. 4 ergibt sich, daß bei *Temperaturerhöhung* die *Viscosität* fast momentan tief abfällt. Bei einer Temperaturerhöhung von 8° C auf 33° C geht sie innerhalb einer Stunde von $47{,}1 \pm 1{,}2$ auf $21{,}9 \pm 0{,}9$ min Plasmolysezeit zurück. Geht der Temperatursprung nur von 8° C auf 25° C, ist die Änderung der Viscosität etwas geringer und langsamer; sie geht innerhalb der ersten Stunde von $51{,}0 \pm 1{,}5$ auf $30{,}2 \pm 1{,}1$ min Plasmolysezeit zurück und erniedrigt sich in der 2. Std nochmals auf $26{,}3 \pm 1{,}0$ min Plasmolysezeit. Demgegenüber ist der Abfall des *osmotischen Wertes* viel geringfügiger und vor allem viel langsamer. Bei der Temperaturerhöhung von 8° C auf 33° C werden 30 Std benötigt, um von 0,462 auf

0,395 G. M. Rohrzucker zu kommen, und beim Temperaturanstieg von 8° C auf 25° C 20 Std für einen Abfall von 0,484 auf 0,425 G. M. Rohrzucker.

Auf diese Reaktionsphase folgt bei der Viscosität *keine* Restitutionsphase; ihr stark herabgesetzter Wert bleibt während der ganzen Beobachtungszeit von 40 Std innerhalb der Fehlergrenzen unverändert.

Da die Viscosität nach der Temperaturerhöhung von 8° C auf 33° C und 25° C innerhalb einer Stunde auf einen tieferen Wert absinkt, erfolgt vermutlich auch schon während der Plasmolysezeitbestimmung bei höherer Temperatur als der eigentlichen Versuchstemperatur eine Viscositätsverringerung. Dann ist die

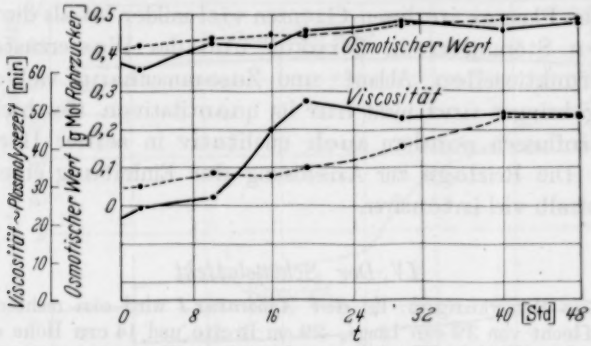


Abb. 5. Temperatursenkung. Viscosität und osmotischer Wert der Versuchspflanzen nach einem Temperaturwechsel von 33° C (ausgezogene Linie), bzw. 25° C (gestrichelte Linie) auf 8° C. Konstanter Bodenwassergehalt 75 % der Wasserkapazität

Viscosität bei 8° C größer als unsere bei 15° C—20° C ermittelten Werte (S. 127) erkennen lassen, und damit sind auch die Differenzen der Plasmolysezeiten für 8° C und 33° C bzw. 25° C größer.

Im umgekehrten Fall der *Temperaturerniedrigung* ändert sich die *Viscosität* nicht schnell, sondern die Angleichung an den neuen Gleichgewichtszustand erfolgt sehr zögernd und erst allmählich sich steigernd (Abb. 5). In der von 33° C ausgehenden Versuchsserie werden nach Versetzung in die 8° C-Kammer 10 Std benötigt, um den Viscositätswert von $21{,}5 \pm 0{,}7$ auf $27{,}0 \pm 1{,}0$ min Plasmolysezeit zu erhöhen; darauf erfolgt eine Beschleunigung des Vorganges, die in weiteren 10 Std zu dem Gleichgewichtswert von $52{,}1 \pm 1{,}3$ min Plasmolysezeit führt. Bei dem geringeren Temperatursprung von 25° C auf 8° C vollzieht sich die Umstellung langsamer und gleichmäßiger. In 10 Std sind, von $29{,}6 \pm 0{,}8$ min Plasmolysezeit ausgehend $33{,}2 \pm 1{,}0$ erreicht, und weitere 30 Std sind notwendig, um den Gleichgewichtszustand von $48{,}0 \pm 1{,}4$ min Plasmolysezeit zu erreichen. Die Umstellung des *osmotischen Wertes* erfolgt wie im umgekehrten Fall langsam und gleichmäßig.

Wenn die Viscosität bei 8° C größer ist als aus den Meßergebnissen hervorgeht (s. oben), dann ist auch der Viscositätsanstieg nach der Temperatursenkung von 33° C bzw. 25° C auf 8° C größer.

Die Frage, warum die Viscositätsänderung bei steigender Temperatur viel schneller erfolgt als bei fallender, liegt außerhalb des Rahmens unserer Arbeit und kann auf Grund unseres Materials nicht entschieden werden. Es ist denkbar, daß dabei ganz einfach die erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit bei höherer Temperatur eine Rolle spielt. Was von uns untersucht werden sollte, war die Frage, ob der Temperatureffekt ebenso wie der Dürreeffekt nach der Reaktionsphase eine regulatorische Restitution und Abhärtung auslöst. Das ist wenigstens innerhalb der untersuchten Bereiche von 8°—36° C eindeutig *nicht* der Fall. Wir möchten das darauf zurückführen, daß der Temperatureingriff in die Struktur des Plasmas in diesen Grenzen viel milder ist als die Austrocknung, deren Störungen der Struktur und des Wasserzustandes den normalen funktionellen Ablauf und Zusammenhang viel stärker in Unordnung bringen und nicht nur im quantitativen Geschwindigkeitsablauf beeinflussen sondern auch qualitativ in seiner Harmonie erschüttern. Die Reizlage zur Auslösung der Einleitung einer Restitution ist deshalb viel intensiver.

IV. Der Schütteleffekt

Apparative Bemerkungen: Bei der *Apparatur I* wird ein rechteckiger Korb aus Drahtgeflecht von 39 cm Länge, 29 cm Breite und 14 cm Höhe durch einen 12 Watt-Motor über einen vorn am Korb angreifenden Exzenter auf vier elastischen Metallstäben von 14 cm Höhe hin und her bewegt. Die Gefäße (800 cm^3-Bechergläser) mit den Versuchspflanzen werden mit Draht an den Innenseiten seiner Wandung befestigt. Die Bewegung ist ungleichförmig beschleunigt. Die Pflanzen erfahren in zwei entgegengesetzten Richtungen abwechselnd eine Beanspruchung auf Zug und Druck. Die Amplitude beträgt $\alpha = 0{,}8$ cm. Die Frequenz der Schwingungen ist mit einem Vorschaltwiderstand auf $f = 5$ Hz eingestellt worden. Die Winkelgeschwindigkeit $\omega = 2\pi f$ berechnet sich zu 31,4 sec^{-1}. Für einen geschüttelten Körper mit der Masse $m = 1$ g beträgt die größte Kraft $\pm\, ma\omega^2 \approx \pm 0{,}8$ p, die mittlere Kraft $\pm \frac{2}{\pi} ma\omega^2 \approx \pm\, 0{,}5$ p. Auf geschüttelte Objekte wirkt eine maximale Beschleunigung $a\omega^2 \approx 790$ cm sec^{-2}. Die mittlere Beschleunigung beträgt $\frac{2}{\pi} a\omega^2 \approx 500$ cm sec^{-2}. Für eine Dauerbelastung ist die Apparatur I nicht vorgesehen. Hierfür steht die *Apparatur II* zur Verfügung. Bei dieser schwingt eine runde Metallplatte von 21 cm Durchmesser, durch einen 15 Watt-Motor mit einem im Zentrum ihrer Unterseite angreifenden Exzenter angetrieben, auf drei je 5 cm hohen Gummimuffen, die auf 6 cm hohen 18 mm-Rundstäben montiert sind. Auf der Metallplatte ist eine Kunststoffplatte mit Haltern für die Versuchsgefäße (250 cm^3-Kunststoffgläser) aufgeschraubt. Die Bewegung ist kreisförmig, d. h. gleichförmig beschleunigt. Dabei behält die Pflanze ihre Orientierung im Raum bei. Eine Beanspruchung auf Zug und Druck erfolgt im Kreise umlaufend in allen Richtungen des Pflanzenquerschnitts. Die Amplitude beträgt $a = 0{,}5$ cm. Die Frequenz der Schwingungen ist durch einen Vorschaltwiderstand auf $f = 6$ Hz festgelegt worden. Die Winkelgeschwindigkeit berechnet sich zu $w = 37{,}68$ sec^{-1}. Für einen geschüttelten Körper mit der Masse $m = 1$ g beträgt die Kraft $K = ma\omega^2 \approx 0{,}72$ p. Auf geschüttelte Objekte wirkt eine Beschleunigung von $b = a\omega^2 \approx 709{,}89$ cm sec^{-2}.

a) Versuche mit kurzer Schütteldauer. Bei der Apparatur I ist zur Erzielung einer Schüttelwirkung eine *Schütteldauer* von mindestens 5—10 min erforderlich. Früher können Unterschiede zwischen geschütteltem und ungeschütteltem Plasma nicht festgestellt werden, weder bei F.- noch bei T.-Pflanzen. Auf der anderen Seite bringt längeres Schütteln als 10 min keine Verstärkung des Effektes. Ähnliche Feststellungen haben Müller-Stoll und Möhr (1958) bei ihren Bewindungsversuchen gemacht. Die Reaktion scheint also einem *„Alles-oder-Nichts"*-Gesetz zu folgen, was etwas unerwartet ist.

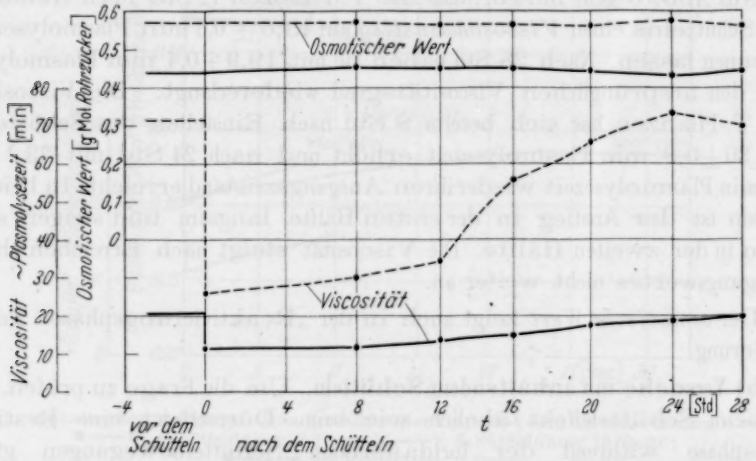


Abb. 6. Kurzfristiges Schütteln. Schütteldauer 10—15 min. Viscosität und osmotischer Wert von Feuchtkulturpflanzen (ausgezogene Linie) bzw. Trockenkulturpflanzen (gestrichelte Linie) vor und nach dem Schütteln

Die durch Schüttelbewegungen an F.- bzw. T.-Pflanzen hervorgerufenen *Viscositätsänderungen* sind in Abb. 6 dargestellt. Während eines 10—15 min langen Schüttelns der Pflanzen auf Apparatur I hat sich die Viscosität der F.-Pflanzen (100% der Bodenwasserkapazität, 60—70% relative Luftfeuchte, 25° C Raumtemperatur) von $20{,}6 \pm 0{,}4$ auf $11{,}3 \pm 0{,}6$ min Plasmolysezeit, d. h. um 45% des Normalwertes, verringert. Die Plasmolysezeiten der T.-Pflanzen (22% der Bodenwasserkapazität, 40—50% relative Luftfeuchte, 36° C Raumtemperatur) sind von $71{,}2 \pm 0{,}9$ auf $25{,}8 \pm 0{,}8$ min, also um 64%, zurückgegangen. Daß der Reaktionswert der T.-Pflanzen noch mehr als 2mal so hoch liegt wie der Reaktionswert der F.-Pflanzen, zeigt, daß die durch Abhärtung des Plasmas erzielte Viscositätserhöhung der T.-Pflanzen nicht absolut, aber doch bis zu einem gewissen Grad auch gegen mechanisches Schütteln schützt.

Bei orientierenden Versuchen ist eine Änderung des *osmotischen Wertes* durch das Schütteln nicht beobachtet worden[1]. Deshalb haben wir bei den Plasmolysezeitbestimmungen vor und unmittelbar nach dem Schütteln ein gleichkonzentriertes Plasmolyticum verwendet. Nach Einstellen der kurzfristigen, an der Schwelle liegenden Schüttelbewegung stellt sich der ursprüngliche Wert der Viscosität wieder ein. Die Vorgänge entsprechen STOCKERS „*Reaktivierungsphase*" (STOCKER 1596b, S. 712). Man könnte hier auch von „Ausgleichs"- oder „Normalisierungsphase" sprechen.

Aus Abb. 6 geht hervor, daß die F.-Pflanzen 12 Std nach Aufhören des Schüttelns einen *Viscositätsanstieg* auf $13{,}6 \pm 0{,}6$ min Plasmolysezeit erkennen lassen. Nach 28 Std haben sie mit $19{,}9 \pm 0{,}4$ min Plasmolysezeit den ursprünglichen Viscositätsgrad wiedererlangt. Die Viscosität der T.-Pflanzen hat sich bereits 8 Std nach Einstellen des Schüttelns auf $30 \pm 0{,}8$ min Plasmolysezeit erhöht und nach 24 Std mit $73{,}1 \pm 1{,}0$ min Plasmolysezeit wieder ihren Ausgangszustand erreicht. In beiden Fällen ist der Anstieg in der ersten Hälfte langsam und steigert sich dann in der zweiten Hälfte. Die Viscosität steigt nach Erreichen ihres Ausgangswertes nicht weiter an.

Der *osmotische Wert* zeigt auch in der „Reaktivierungsphase" keine Änderung.

b) Versuche mit anhaltendem Schütteln. Um die Frage zu prüfen, ob es beim Schütteleffekt ähnlich wie beim Dürreeffekt eine Restitutionsphase während der fortdauernden Schüttelbewegungen gibt, wurden Pflanzen 8, 10 und 33 Tage lang ununterbrochen auf der Apparatur II geschüttelt (Abb. 7). Beim 8tägigen Schütteln herrschten 20° C und 73% relative Luftfeuchte, beim 10tägigen 26°—30° C und 60—65% relative Luftfeuchte und beim 33tägigen 20° C und 65% relative Luftfeuchte. Der Bodenwassergehalt betrug jedesmal 75% der Wasserkapazität. Diese Versuchsreihen ergeben übereinstimmend, daß während des Schüttelns tatsächlich eine, wenn auch langsame Restitution stattfindet; sie ist von MÜLLER-STOLL und MÖHR (S. 466) übersehen worden, weil ihre Schüttelzeiten nur 30—60 min betragen haben. Beim 10tägigen Versuch im Mai/Juli zeigte die Viscosität der Zellen 2 Std nach dem Beginn des Schüttelns einen Abfall von $17{,}2 \pm 0{,}8$ auf $11{,}1 \pm 1{,}1$ min Plasmolysezeit, d. h. um 35%, beim 8tägigen im November/Dezember von $27{,}5 \pm 0{,}3$ auf $20{,}4 \pm 0{,}7$ min Plasmolysezeit, also um 26% und beim 33tägigen im Januar/Februar schließlich von $29{,}7 \pm 0{,}8$

[1] MÜLLER-STOLL und MÖHR (1958) stellten an geschüttelten Blättern von *Silene pendula* eine Herabsetzung des osmotischen Wertes fest. Diese betrug nach der plasmometrischen Methode 11,5%, nach der kryoskopischen Methode von WALTER an Preßsäften aus abgetötetem Blattmaterial 2,5—5,5%. Es mußte also eine Verminderung osmotisch wirksamer Substanz erfolgt sein.

auf $20{,}7 \pm 1{,}2$ min Plasmolysezeit, das ist um 30%. Die „Reaktionswerte" liegen erheblich höher als in Abb. 6 vom Juli/August, wo die Viscosität auch bei F.-Pflanzen etwa auf 50% gefallen ist. Es besteht die Möglichkeit, daß nach 2 Std schon die Restitution eingesetzt hat. Der Betrag derselben kann aber nach dem Kurvenverlauf nicht hoch sein.

Nach 8 Tagen (Abb. 7) war die *Viscosität* des geschüttelten Plasmas von $20{,}4 \pm 0{,}7$ auf $25{,}7 \pm 0{,}6$ min Plasmolysezeit angestiegen. Da sich der Kontrollwert der ungeschüttelten Pflanzen auf $28{,}1 \pm 0{,}4$ min

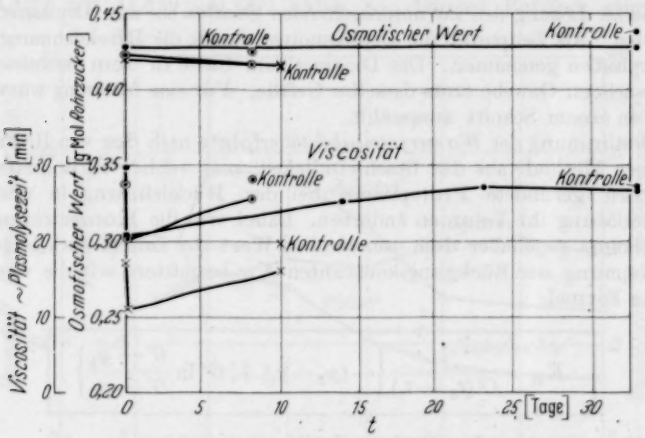


Abb. 7. Anhaltendes Schütteln. Das Verhalten der Viscosität und des osmotischen Wertes. ●—● Schütteldauer 8 Tage; ×—× Schütteldauer 10 Tage; ●—● Schütteldauer 33 Tage

Plasmolysezeit belief, war die Restitution noch nicht vollständig. Das gleiche gilt für den 10tägigen Versuch (Abb. 7). Hier betrug der Endwert der geschüttelten Pflanzen $16{,}1 \pm 0{,}8$ und der Kontrollwert ungeschüttelter Pflanzen $19{,}7 \pm 1{,}0$ min Plasmolysezeit. Im dritten Versuch (Abb. 7) wurde nach einer Schütteldauer von 14, 23 und 33 Tagen kein Viscositätsunterschied zwischen geschütteltem und ungeschütteltem Plasma mehr festgestellt. Die Restitution war hier also vollständig erfolgt.

Das Vorhandensein einer Reaktions- und Restitutionsphase bei dauerndem Schüttelreiz ist also bewiesen. Letztere führt aber, im Gegensatz zum Dürreeffekt, nicht zu einem den Ausgangswert überschreitenden „*Abhärtungszustand*", jedenfalls nicht in den von uns geprüften, immerhin sehr langen Schüttelperioden von bis zu 33 Tagen. Man darf daraus wohl schließen, daß die durch das Schütteln verursachten Eingriffe in die plasmatische Struktur und den Stoffwechsel nicht so tiefgreifend sind wie die des Dürreeffektes und damit eine hinsichtlich der Geschwindigkeit und der Intensität schwächere Restitution induzieren.

Eine Änderung des *osmotischen Wertes* wurde auch bei anhaltendem Schütteln nicht beobachtet.

D. Permeabilität

I. Methodik

Die *Harnstoff-* und *Glycerinpermeabilität* wurde nach der *Deplasmolysezeitmethode* (FITTING 1917) gemessen, wobei die Deplasmolysezeit T der Permeabilität μ indirekt proportional gesetzt wird. Wir hielten uns an die von FITTING gegebene Definition der Deplasmolysezeit als Zeitspanne vom Einlegen der Schnitte in eine hypertonische Lösung des zu untersuchenden Stoffes bis zur Deplasmolyse ihrer Protoplasten. Als Zeitpunkt der Deplasmolyse wurde die Rückdehnung von 50% der Protoplasten genommen. Das Diosmotikum hatte zu dem osmotischen Wert der untersuchten Gewebe stets dasselbe Gefälle. Für eine Messung wurden 20 bis 30 Zellen an einem Schnitt ausgezählt.

Die Bestimmung der *Wasserpermeabilität* erfolgte nach der von HÖFLER (1930) angegebenen Methode aus der Geschwindigkeit, mit welcher in Rohrzuckerlösung plasmolytisch gerundete Protoplasten bei der Rückdehnung in verdünnterer Rohrzuckerlösung ihr Volumen änderten. Dabei war die Konzentration des Deplasmolytikums gegenüber dem osmotischen Wert der Zellen noch hypertonisch. Zur Bestimmung der Rückgangskonstanten K_R benutzten wir die von HÖFLER abgeleitete Formel:

$$K_R = \frac{1}{C'(t_2 - t_1)} \left\{ -(y_2 - y_1) + G' \ln \frac{G' - y_1}{G' - y_2} \right\}$$

C' = Konzentration des Deplasmolytikums.
y_1, y_2 = beliebig gewählte Plasmolysegrade zu den Zeiten t_1, t_2.
G' = Endgrad der Plasmolyse im Deplasmolytikum.

Die Rückgangskonstante gibt den Zahlenwert des Verhältnisses der zeitlichen Plasmolysegradänderung des Protoplasten zum osmotisch wirksamen Gefälle an. Da jedoch bei gleichem Gefälle die Deplasmolyse schneller abläuft als die vorausgegangene Plasmolyse, dürfen die Rückgangskonstanten nicht als die ursprünglichen Werte für die Wasserdurchlässigkeit angesehen werden.

Abgesehen von einem Teil der Schüttelversuche, deren Ergebnisse im jeweiligen Versuchsraum selbst aufgezeichnet wurden (Abb. 12, 13), nahmen wir die Messungen wieder in einem den Klimakammern benachbarten Raum vor, dessen Temperatur zwischen 15° C und 20° C schwankte. Oft war die Versuchstemperatur höher. Da sich die Permeabilitätsverhältnisse bei den Temperaturversuchen nach einem Wechsel von 32° C auf 15° C in den ersten 5 Std wenig geändert haben (Abb. 11), ist wohl anzunehmen, daß die Untersuchung der Präparate, die stets in eine solche Zeitspanne gefallen ist, auch für höhere Versuchstemperaturen als 15°—20° C brauchbare Werte geliefert hat. Tiefere Temperaturen als 15° C sind bei den Permeabilitätsversuchen nicht vorgekommen.

II. Änderung des Bodenwassergehaltes bei gleichbleibender Temperatur

Unsere Untersuchungen beziehen sich auf den *zeitlichen Ablauf* der bei Dürreeinwirkung stattfindenden Permeabilitätsänderungen. Der für solche Untersuchungen notwendige Zeitaufwand hat uns veranlaßt,

sie auf den entscheidenden Punkt, den schnellen *Austrocknungsvorgang*, zu konzentrieren und zu beschränken.

a) Die Austrocknungs-(Reaktions-)phase. Die Erde wurde in den Kulturgläsern bei 32° C Raumtemperatur und 65% relativer Luftfeuchte innerhalb von 36 Std von 90% auf 28% der Bodenwasserkapazität ausgetrocknet. In dieser Zeit erhöhte sich die *Harnstoffpermeabilität* von $0{,}053 \pm 0{,}002$ auf $0{,}070 \pm 0{,}002$ min^{-1}, die *Glycerinpermeabilität* von $0{,}035 \pm 0{,}001$ auf $0{,}042 \pm 0{,}002$ min^{-1} und die *Wasserpermeabilität* von $0{,}367 \pm 0{,}011$ auf $0{,}439 \pm 0{,}007$ (Abb. 8). Dieser Befund stimmt mit

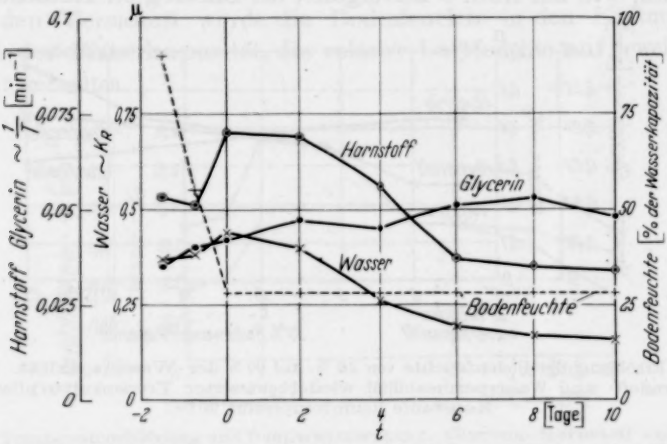


Abb 8. Schnelle Erdaustrocknung. Glycerin-, Harnstoff- und Wasserpermeabilität der Versuchspflanzen beim Übergang von Feucht- zur Trockenkultur. Konstante Raumtemperatur 32° C

Stockers Vorstellung überein, daß in der Reaktionsphase die Poren des plasmatischen Netzes durch Lockerung oder Zerreißung von Haftpunktbindungen vergrößert werden. Es sei noch darauf hingewiesen, daß bei Reizerscheinungen sehr allgemein zunächst eine Steigerung der Permeabilität eintritt.

Der Harnstofftypus der Pflanzen bleibt während der Reaktionsphase erhalten.

b) Die Trocken-(Restitutions-)phase. Wenn die durch schnelle Austrocknung erreichte Bodenfeuchte von 28% der Wasserkapazität konstant gehalten wird, beginnt die *Harnstoffpermeabilität* zuerst langsam, dann schneller abzusinken. Nachdem sie in der Reaktionsphase vom Ausgangswert der F.-Pflanzen $0{,}053 \pm 0{,}002$ auf $0{,}070 \pm 0{,}002$ min^{-1} gestiegen ist, fällt sie nun in etwa 4 Tagen auf den Ausgangswert zurück, bleibt aber hier nicht stehen, sondern geht entsprechend der Viscosität in eine „Abhärtungsphase" über, in welcher nach weiteren 2 Tagen ein Gleichgewichtszustand von $0{,}035 \pm 0{,}001$ erreicht wird. Demselben

Verlauf folgt die *Wasserpermeabilität*, die nach dem Anstieg in der Reaktionsphase von $0{,}367 \pm 0{,}011$ Ausgangswert auf $0{,}439 \pm 0{,}007$ nun in $2^1/_2$ Tagen wieder auf den Ausgangswert absinkt und in etwa 6 weiteren Tagen das Abhärtungsgleichgewicht von $0{,}169 \pm 0{,}006$ erreicht (Abb. 8). Die Veränderungen der Harnstoff- und Wasserpermeabilität entsprechen also durchaus gesichert dem, was nach STOCKERs Theorie für die Reaktions-, Restitutions- und Abhärtungsphase einer Porenpermeabilität zu erwarten ist.

Anders liegen die Verhältnisse bei der *Glycerinpermeabilität*. Hier setzt sich, wie aus Abb. 8 hervorgeht, der Anstieg der Reaktionsphase

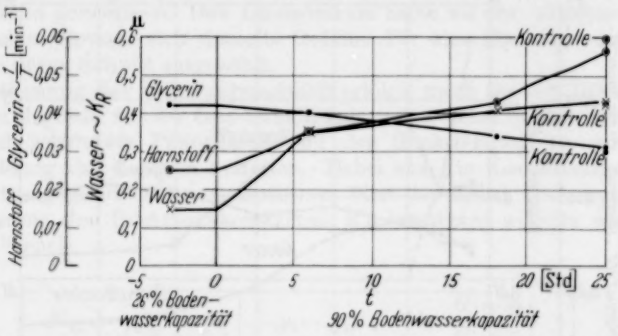


Abb. 9. Erhöhung der Bodenfeuchte von 26 % auf 90 % der Wasserkapazität. Glycerin-, Harnstoff- und Wasserpermeabilität wiederbewässerter Trockenkulturpflanzen. Konstante Raumtemperatur 30° C

von $0{,}035 \pm 0{,}001$ auf $0{,}042 \pm 0{,}002$ min^{-1} auch in der Trockenperiode von konstant 28 % der Wasserkapazität weiter fort, wenn auch zögernd und unter Schwankungen, zu einem unscharfen Gleichgewicht von ungefähr 0,050 min^{-1}. In der Restitutionsphase sind damit die Pflanzen vom Harnstofftyp zum Glycerintyp übergegangen. Der Befund von SCHMIDT (STOCKER 1956b, S. 704) an dauernd trocken kultivierten *Lamium*pflanzen wird damit bestätigt. Ebenso bietet sich die von SCHMIDT gegebene Deutung einer dürrebedingten Änderung der Eiweiß-Lipoidstruktur der Plasmagrenzschichten auch heute noch als wahrscheinlich an, wenn auch die Ansichten über den submikroskopischen Feinbau der Plasmamembranen eine präzise Theorie noch nicht erlauben (vgl. z. B. BOGEN 1956).

c) Die Wiederbewässerungsphase. Die Untersuchungen beziehen sich auf Pflanzen, welche nach 10tägiger Trockenphase bei 26 % der Bodenwasserkapazität auf 90 % der Wasserkapazität wiederbewässert wurden. Die Lufttemperatur der Klimakammer betrug 30° C, die relative Luftfeuchte 65 %.

Wir entnehmen aus Abb. 9, daß die Rückführung der Permeabilität auf den Normalzustand von F.-Pflanzen in denselben kurzen Zeiten

erfolgt, die wir bei der Viscosität kennen gelernt haben (Abb. 3). Innerhalb von etwa 25 Std ist die Angleichung der Deplasmolysezeiten und Rückgangskonstanten der wiederbewässerten T.-Pflanzen an die der F.-Kontrollpflanzen erfolgt. Dabei hat die Durchlässigkeit des Plasmas für *Wasser* und *Harnstoff* zu-, für *Glycerin* abgenommen. Die Pflanzen sind vom Glycerin- wieder zum Harnstofftypus übergegangen, wobei sich offenbar auch die submikroskopische Feinstruktur der Plasmamembranen in den Ausgangszustand zurückgebildet hat.

III. Änderung der Temperatur bei gleichbleibendem Bodenwassergehalt

Bei den Versuchen wurde die Bodenfeuchte in den Kulturgläsern auf 75% der Wasserkapazität, die relative Luftfeuchte auf jeweils 60% konstant gehalten.

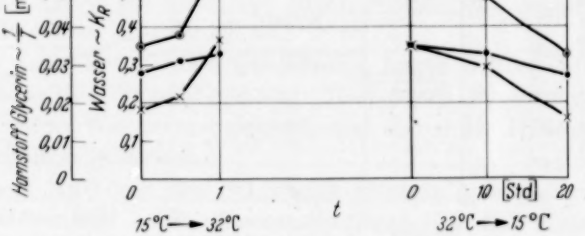


Abb. 10. Temperaturerhöhung und Temperatursenkung. Glycerin-, Harnstoff- und Wasserpermeabilität der Versuchspflanzen nach einem Temperaturwechsel von 15° C auf 32° C und umgekehrt. Konstanter Bodenwassergehalt 75 % der Wasserkapazität.
●——● Glycerin; ●——● Harnstoff; ×——× Wasser

Die erste Versuchsreihe galt einem Temperatursprung von 15° C *auf 32° C* (Abb. 10). Für alle drei untersuchten Stoffe erhöhte sich die Permeabilität, für Harnstoff und Wasser allerdings erheblich mehr als für Glycerin, wobei sich der Anstieg allmählich beschleunigte. Die Geschwindigkeit der Neueinstellung entspricht der der Viscositätsänderung (Abb. 4). Eine Stunde nach dem Temperaturwechsel hatte sich die Durchlässigkeit des Plasmas für *Harnstoff* von $0{,}035 \pm 0{,}001$ auf $0{,}058 \pm 0{,}002$ min^{-1}, d. h. um 66%, für *Glycerin* von $0{,}028 \pm 0{,}000$ auf $0{,}033 \pm 0{,}001$ min^{-1}, d. h. um 18% und für *Wasser* von $0{,}183 \pm 0{,}020$ auf $0{,}366 \pm 0{,}008$, also um 100% des Ausgangswertes erhöht. Diese Werte entsprechen denen von Pflanzen, die tagelang auf 32° C kultiviert worden waren und entsprechen deshalb vermutlich den Werten des Gleichgewichtes. Da uns die Temperaturfrage nur am Rande interessiert, sind die Versuche nicht länger fortgesetzt worden. Jedenfalls lassen sie ebensowenig wie die Viscositätsversuche irgendwelche Anzeichen einer Restitutionsphase erkennen.

Bei einer Temperatursenkung von *32° C auf 15° C* (Abb. 10) tritt eine Verringerung der Permeabilität ein, die größenmäßig der Erhöhung im vorigen Versuch entspricht. Die Werte sanken für *Harnstoff* von $0{,}050 \pm 0{,}002$ auf $0{,}033 \pm 0{,}001$ min^{-1}, für *Glycerin* von $0{,}035 \pm 0{,}001$ auf $0{,}027 \pm 0{,}000$ min^{-1} und für *Wasser* von $0{,}348 \pm 0{,}012$ auf $0{,}159 \pm 0{,}015$ ab und lagen damit wieder auf dem Ausgangsniveau. Dazu war allerdings, wieder in Parallele zur Viscosität, eine erheblich längere Zeit, etwa 20 Std, notwendig als für die Permeabilitätserhöhung bei Temperatursteigerung, die innerhalb einer Stunde erfolgt war.

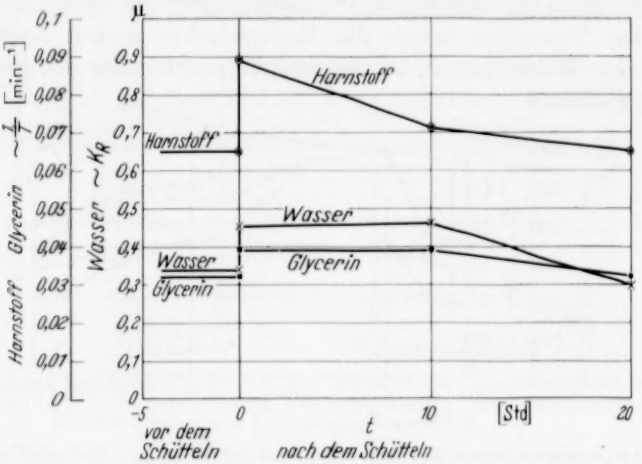


Abb. 11. Kurzfristiges Schütteln. Schütteldauer 2 Std. Glycerin-, Harnstoff- und Wasserpermeabilität der Versuchspflanzen vor und nach dem Schütteln

Da sich der Temperatureinfluß bei der Harnstoffpermeabilität stärker bemerkbar macht als bei der Glycerinpermeabilität, nimmt der Harnstofftyp der Pflanzen mit Temperaturerhöhung zu und wird durch Temperaturerniedrigung abgeschwächt.

IV. Der Schütteleffekt

Die Versuche wurden ausnahmslos mit der unter C IV b beschriebenen Apparatur II durchgeführt.

a) Versuche mit kurzer Schütteldauer. Es wurde untersucht, welchen Einfluß ein *2 Std langes Schütteln* auf die Permeabilität hat. Der Bodenwassergehalt in den Versuchsgläsern betrug 75% der Wasserkapazität, die Raumtemperatur 30° C und die relative Luftfeuchte 65%. Abb. 11 zeigt den Gesamtverlauf der durch das Schütteln hervorgerufenen Permeabilitätsänderungen.

Als Reaktion erfolgt ein Ansteigen der Harnstoff-, Glycerin- und Wasserpermeabilität während des Schüttelns. Dieser Befund kann als weitere Bestätigung der Vorstellung angesehen werden, daß das

plasmatische Gefüge in der Reaktionsphase aufgelockert wird, wodurch auch die Poren der Grenzhäute größer werden. In der Ruhe werden die Ausgangsverhältnisse wiederhergestellt. Der Vorgang stellt nach genauer Nomenklatur *keine* Restitution sondern eine *„Reaktivierung"* dar (vgl. S. 138). Die Zeiten, welche die Permeabilitätsänderungen benötigen, entsprechen denen, die wir für die Viscositätsänderungen festgestellt haben (Abb. 6).

Während des Schüttelns stieg die *Harnstoffpermeabilität* von $0{,}065 \pm 0{,}005$ auf $0{,}089 \pm 0{,}006$ min^{-1}, die *Glycerinpermeabilität* von $0{,}032 \pm 0{,}001$ auf $0{,}039 \pm 0{,}002$ min^{-1} und die *Wasserpermeabilität* von $0{,}338 \pm 0{,}010$ auf $0{,}452 \pm 0{,}017$ an. Die Harnstoffpermeabilität erhöhte sich also um 37%, die Glycerinpermeabilität nur um 22% des Ausgangswertes; der Harnstofftyp der Pflanzen wurde also verstärkt. Die Versuche mit anhaltendem Schütteln ergaben, daß in der Reaktionsphase aber auch eine stärkere Erhöhung der Glycerin- als der Harnstoffpermeabilität (Abb. 13) oder eine gleich starke Permeationsförderung beider Stoffe (Abb. 12) möglich ist.

Bei der schnellen Bodenaustrocknung hatte sich ebenfalls in der *Reaktionsphase* die Permeabilität für Harnstoff, Glycerin und Wasser erhöht (Abb. 8). Wie beim Schütteln war dabei der Harnstofftyp der Pflanzen erhalten geblieben.

Nach dem Aufhören des Schüttelns erfolgte innerhalb von 20 Std die „Reaktivierung". Die *Harnstoffpermeabilität* fiel innerhalb von 10 Std auf $0{,}071 \pm 0{,}004$ min^{-1} ab und hatte nach weiteren 10 Std mit $0{,}065 \pm 0{,}003$ min^{-1} wieder ihre ursprüngliche Größe erreicht. Die *Glycerin-* und *Wasserpermeabilität* ließen 10 Std nach der Beendigung des Schüttelns noch keinen Rückgang ihrer Werte erkennen, waren aber 10 Std später mit $0{,}032 \pm 0{,}001$ min^{-1} bzw. $0{,}296 \pm 0{,}018$ gleichfalls auf ihr Ausgangsniveau abgesunken.

b) Versuche mit anhaltendem Schütteln. Bei unseren Versuchen mit einer *Schütteldauer von 16* (Abb. 12) *und 33 Tagen* (Abb. 13) betrugen der Bodenwassergehalt 75% der Wasserkapazität, die Raumtemperatur 20° C und die relative Luftfeuchte im ersten Fall 73% und im zweiten 65%.

In beiden Versuchsreihen trat zunächst die schon bei kurzfristigem Schütteln beobachtete Erhöhung der Harnstoff-, Glycerin- und Wasserpermeabilität ein. Während des fortdauernden Schüttelns erfolgte langsam ein Rückgang auf die Ausgangswerte. In allen Fällen erlauben die Permeabilitätsänderungen also eine deutliche Unterscheidung von Reaktions- und Restitutionsphase. Eine „Abhärtung", wie beim Dürreeffekt, tritt in Parallele zu den Viscositätsänderungen (Abb. 7) nicht ein. Wir sehen damit unsere Vermutung (S. 139) bestätigt, daß die Plasmastruktur beim Schütteleffekt eine geringere Störung erfährt und dadurch

zu einer hinsichtlich Intensität und Geschwindigkeit schwächeren Restitution angeregt wird als beim Dürreeffekt.

Beim 16tägigen Schütteln (Abb. 12) wurde 2 Std nach dem Schüttelbeginn für die *Harnstoffpermeabilität* ein Anstieg vom Ausgangswert 0,052 min^{-1} auf 0,072 min^{-1}, für die *Glycerinpermeabilität* vom Ausgangswert 0,038 min^{-1} auf 0,052 min^{-1} und für die *Wasserpermeabilität*

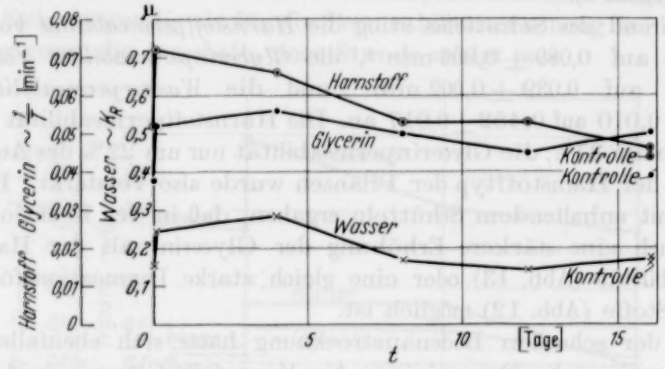


Abb. 12. Anhaltendes Schütteln (16 Tage). Glycerin-, Harnstoff- und Wasserpermeabilität

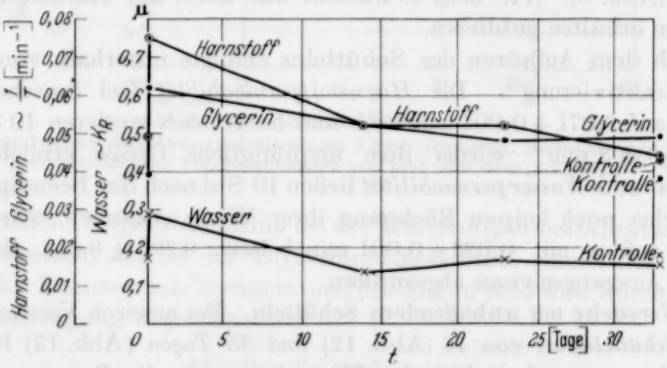


Abb. 13. Anhaltendes Schütteln (33 Tage). Glycerin-, Harnstoff- und Wasserpermeabilität

vom Ausgangswert 0,155 auf 0,244 festgestellt. Damit hatte sich die Harnstoffpermeabilität um 38%, die Glycerinpermeabilität um 37% des Ausgangswertes erhöht, d. h. Harnstoff und Glycerin waren ungefähr gleich stark in ihrem Durchtritt durch das Plasma beschleunigt worden (vgl. S. 145). Innerhalb von 8 Tagen wurde für *Harnstoff* und *Wasser* mit den Werten 0,053 min^{-1} und 0,169 die Restitution erreicht. Die *Glycerinpermeabilität* lag nach 8 Tagen mit 0,050 min^{-1} noch über dem Ausgangswert und sank auch während der folgenden 8 Tage noch nicht bis auf den Kontrollwert der ungeschüttelten Pflanzen von 0,039 min^{-1} ab. An sich wäre denkbar, daß die Restitution der Lipoid-Eiweiß-

Struktur besondere Schwierigkeiten macht. Die Durchlässigkeit des Plasmas für Harnstoff und Wasser erwies sich bei Versuchsende bei den geschüttelten und den ungeschüttelten Pflanzen als gleich groß.

Die Versuchsreihe mit 33tägiger Schütteldauer (Abb. 13) ergab nach den ersten 2 Std einen Anstieg der *Harnstoffpermeabilität* von $0{,}049 \pm 0{,}002\ \text{min}^{-1}$ Ausgangswert auf $0{,}075 \pm 0{,}008\ \text{min}^{-1}$, der *Glycerinpermeabilität* von $0{,}039 \pm 0{,}001\ \text{min}^{-1}$ Ausgangswert auf $0{,}062 \pm 0{,}002\ \text{min}^{-1}$ und der *Wasserpermeabilität* von $0{,}172 \pm 0{,}012$ Ausgangswert auf $0{,}288 \pm 0{,}037$. Die Harnstoffpermeabilität war somit um 53%, die Glycerinpermeabilität um 59% des Ausgangswertes erhöht worden. Diesmal war also der Harnstofftyp der Pflanzen in der Reaktionsphase abgeschwächt worden (vgl. S. 145). Eine Untersuchung nach 14 Tage langem Schütteln zeigte, daß die *Harnstoffpermeabilität* mit $0{,}052 \pm 0{,}002\ \text{min}^{-1}$ und die *Wasserpermeabilität* mit $0{,}134 \pm 0{,}015$ bereits restituiert waren, während die *Glycerinpermeabilität* mit $0{,}052 \pm 0{,}004\ \text{min}^{-1}$ noch über dem Ausgangswert lag. Nach 33 Tagen wurden für die Glycerinpermeabilität nur noch $0{,}049 \pm 0{,}005\ \text{min}^{-1}$ ermittelt. Der Kontrollwert ungeschüttelter Pflanzen betrug $0{,}038 \pm 0{,}002\ \text{min}^{-1}$. Die Durchlässigkeit des Plasmas für Harnstoff bzw. Wasser war zu diesem Zeitpunkt bei den geschüttelten Pflanzen unverändert so groß wie bei den ungeschüttelten.

Zusammenfassung

1. Dürreeffekt. Bei schneller Bodenaustrocknung erfolgt in der *Reaktions-*(Austrocknungs-)*phase* eine Erniedrigung der *Plasmaviscosität.* Nach der Stabilisierung der Bodenfeuchte auf einem niederen Niveau wird die *Restitutions-*(Trocken-)*phase* deutlich, in welcher die Viscosität wieder ansteigt. Dabei erreicht sie in der *Abhärtungsphase* ein über dem Ausgangswert liegendes Gleichgewicht. Sie fällt auf den Ausgangswert zurück, wenn der Boden wieder optimal durchfeuchtet wird. Bei langsamer Austrocknung des Bodens bleibt in der Reaktionsphase der Viscositätsabfall aus; die Restitutions- und Abhärtungsvorgänge sind die gleichen wie nach der schnellen Austrocknung.

Harnstoff-, *Wasser-* und *Glycerinpermeabilität* werden in der Reaktionsphase des schnellen Austrocknungsvorganges gefördert. Die beiden ersteren nehmen in der Restitutionsphase wieder ab und unterschreiten dabei in der Abhärtungsphase ihre Ausgangswerte. Dagegen steigt die Glycerinpermeabilität noch weiter an. Nach Wiederherstellung optimaler Wasserverhältnisse kehrt die Permeabilität für alle drei geprüften Stoffe in den Normalzustand zurück.

Der *osmotische Wert* steigt in der Reaktionsphase an und hält während der Restitutions- und Abhärtungsphase sein erhöhtes Niveau. Wird der

Boden wieder optimal bewässert, fällt der osmotische Wert auf den Normalwert zurück.

2. Schütteleffekt. Der Schütteleffekt äußert sich in Analogie zum Dürreeffekt in einer Verminderung der *Plasmaviscosität* sowie einer Erhöhung der *Harnstoff-*, *Glycerin-* und *Wasserpermeabilität* in der *Reaktionsphase*. Wird das Schütteln nach dem Eintreten der Reaktion abgebrochen, so führt eine „Reaktivierungs"-Phase bald zu den ursprünglichen Verhältnissen zurück. Bei fortdauerndem Schütteln wird in der *Restitutionsphase* langsam eine Normalisierung erreicht. Eine Abhärtungsphase fehlt.

Der *osmotische Wert* zeigt keinen Schütteleffekt.

3. Temperatureffekt. Der Temperatureffekt hat *nur* eine *Reaktionsphase*, keine Restitutions- und Abhärtungsphase.

Je nachdem, ob die Temperatur erhöht oder erniedrigt wird, nimmt die *Plasmaviscosität* ab oder zu. Gleichzeitig erfolgt eine Steigerung oder Verringerung der *Harnstoff-*, *Glycerin-* und *Wasserpermeabilität*. Der *osmotische Wert* wird herabgesetzt oder erhöht.

Literatur[1]

BEYSEL, D.: Osmotischer Wert und Viscosität des Protoplasmas diploider und polyploider Zuckerrüben. Ber. dtsch. bot. Ges. **70**, 109—120 (1957).

BOGEN, H. J.: Die Theorie der Permeabilität. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. II, S. 439—448. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.

FITTING, H.: Untersuchungen über isotonische Koeffizienten und ihren Nutzen für Permeabilitätsbestimmungen. Jb. wiss. Bot. **57**, 553—612 (1917).

HÖFLER, K.: Über Eintritts- und Rückgangsgeschwindigkeit der Plasmolyse und eine Methode zur Bestimmung der Wasserpermeabilität des Protoplasten. Jb. wiss. Bot. **73**, 300—350 (1930).

LAISNÉ, G.: Les variations de la pression osmotique du suc de tissue de Fraxinus excelsior L. et de quelques autres plantes au cours de la fanaison artificielle. C. R. Acad. Sci. (Paris) **208** (I), 299—301 (1939). Vgl. auch Rev. gén. Bot. **51** (1939).

LEVITT, J.: The hardiness of plants. New York, N.Y.: Academic Press 1956.

MÜLLER-STOLL, W. R., u. M. MÖHR: Über die Beeinflussung plasmatischer Zustandsgrößen durch Wind und windbedingte Schüttelbewegungen bei *Silene pendula*. Z. Bot. **46**, 442—473 (1958).

ROSS, H.: Zellphysiologische Untersuchungen an *Lamium maculatum*. Das Verhalten der Plasmaviscosität bei mechanischen Reizvorgängen. Dipl.-Arbeit Darmstadt 1955.

SIMONIS, W.: Untersuchungen zum Dürreeffekt. I. Morphologische Struktur, Wasserhaushalt, Atmung und Photosynthese feucht und trocken gezogener Pflanzen. Planta (Berl.) **40**, 313—332 (1952).

[1] Aus Gründen der Raumersparnis sind jeweils nur jüngste oder zusammenfassende Arbeiten angeführt, aus denen die vollständigen Zitate im Text genannter früherer Autoren zu entnehmen sind.

Slavik, B.: Über die Dynamik des Wasserdefizits der Pflanzen. [Tschechisch.] Preslia **27**, 124—153 (1955).

Stålfelt, M. G.: The protoplasmic viscosity of terrestrial plants and its sensitivity to light. Protoplasma **45**, 285—292 (1955).

Stocker, O.: Wassermangel und Zellaktivität. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. II, S. 639—654. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956a.

— Die Dürreresistenz. Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. III, S. 696—734. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956b.

Ullrich, H.: Einige Beobachtungen über Doppelbrechung am lebenden Protoplasten, an verschiedenen Zellorganellen, sowie der Zellwand. Planta (Berl.) **26**, 311—318 (1937).

Walter, H., u. K. Schall: Das Verhalten des osmotischen Wertes beim Welken abgeschnittener Blätter. Z. Bot. **45**, 263—272 (1957).

Dr. Helga Ross,
(16) Nieder-Beerbach/Darmstadt, Hintergasse 23

Planta 56, 150—173 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Braunschweig

EIN BEITRAG ZUR PHYSIOLOGIE UND GENETIK DER GESCHLECHTSAUSPRÄGUNG VON *CANNABIS SATIVA*

Von

DIETHARD KÖHLER

Mit 15 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. September 1960)

Einleitung

Man kennt eine große Zahl von genetischen und Umwelt-Faktoren, die bei den verschiedensten Pflanzenarten das Geschlecht beeinflussen, doch ist über ihre Wirkungsweise wenig bekannt. Als Beitrag zur Klärung dieser Frage wurde eine Untersuchung des Hanfes vorgenommen, der sich durch besonders starke genotypische und phänotypische Variabilität in geschlechtlicher Hinsicht auszeichnet.

Im diöcischen Hanf ist wie in anderen Arten das eine Geschlecht für bestimmte Geschlechtsrealisatoren homozygot, das andere heterozygot. Die Realisatoren entscheiden nur darüber, welche der in jedem Fall vorhandenen Gene zur Ausbildung der Geschlechtsorgane (= AG-Komplex nach CORRENS 1928) in Aktion treten. In diesem Sinne sind auch Umweltbedingungen, die das Geschlecht der Pflanzen zu verändern vermögen, als Realisatoren aufzufassen.

Der Hanf besitzt einen Geschlechtsdimorphismus, der sich im Aufbau der Inflorescenz äußert. Er kommt durch die unterschiedliche Bevorzugung der Achsen 2. und 3. Ordnung zustande (EICHLER 1875). Beim Weibchen besteht die Achse 3. Ordnung nur aus einer Blüte in der Achsel eines Vorblattes, beim Männchen dagegen aus einem viele Blüten und Schuppenblätter tragenden Sympodium. Die Achse 2. Ordnung ist beim Weibchen groß und trägt viele Blätter, beim Männchen stellt sie nach dem 1. Knoten ihr Wachstum ein. Dadurch erscheint die weibliche Influorescenz kolbig-gedrungen, die männliche locker-rispig. Der Habitus der Männchen wird von HOFFMANN (1947) als masculinisiert, der der Weibchen als feminisiert bezeichnet. Neben den Männchen und Weibchen treten sämtliche denkbaren Übergänge auf, als Extreme also masculinisierte Weibchen und feminisierte Männchen. Der erste Typ könnte z. B. durch geschlechtliche Variierung eines Männchens oder durch habituelle Variierung eines Weibchens entstanden sein, und zwar als Modifikation oder genetisch bedingte Variation. Diese Vieldeutigkeit jedes Typs ist Ursache für die Differenz der Hypothesen über die Geschlechtsbestimmung beim Hanf von HOFFMANN (1947) einerseits

und v. SENGBUSCH (1952) andererseits. Im Abschnitt Genetik wird ein verbessertes Bild der genetischen Zusammenhänge aller Geschlechtsformen entworfen. Dazu muß zunächst der Einfluß der Umweltbedingungen vor und während der Blüte auf die Geschlechtsausprägung beschrieben werden. Als wichtigster Faktor erwies sich die Photoperiode. Sie beeinflußt die Geschlechtsausprägung entsprechend der photoperiodischen Reaktion. Da der Hanf eine Anzahl unterschiedlich reagierender Rassen enthält, ist der Einfluß einer bestimmten Photoperiode auf verschiedene Rassen nicht einheitlich. Zu Beginn werden daher die Rassen in Hinblick auf ihre photoperiodische Reaktion charakterisiert.

Abschließend wird versucht, alle geschlechtsrealisierenden Faktoren einheitlich zu betrachten und die Art der Verbindung zwischen Realisatoren und AG-Komplex zu erschließen.

Material und Methoden

Folgendes Saatgut stand zur Verfügung:

Schurig-Hanf	frühblühend = F
Seme Canapa Carmagnola (italienischer Hanf)	spätblühend = C
Seme Canapa Pelozella (türkischer Hanf)	spätblühend = P
Indischer Hanf	spätblühend = I
4637 und 4650: Nachkommenschaften monöcischer Pflanzen v. SENGBUSCHs	frühblühend = S
Bernburger Einhäusiger „Hohenturm“	frühblühend = B

Die ersten 4 Sorten sind diöcisch. Der indische Hanf war offenbar stark heterozygot. Er unterscheidet sich vor allem durch die schmalere Blattform von den übrigen Sorten. Die anderen Sorten erschienen sehr einheitlich. Zwischen B und S war kein Unterschied festzustellen.

Die Samen wurden vorgekeimt, die Keimlinge einzeln in Töpfen von 6—7 cm Durchmesser angezogen. Nur bei zwei Versuchen zur endonomen Rhythmik wurden mehrere Pflanzen gemeinsam in größere Töpfe gepflanzt.

Soweit aus Versuchsgründen (Langtag oder Dauerlicht) notwendig, oder weil die schlechten Lichtverhältnisse im Gewächshaus im Winter es erforderten, wurden die Pflanzen unter Leuchtstoffröhren „weiß“, manchmal mit Zumischung von „Warmton“ (was jedoch wenig günstig ist) angezogen. Bei „Starklicht“ betrug die Leistungsaufnahme der Leuchtkörper 333—560 W pro bestrahlten m². Die höchste Intensität wirkt über längere Zeit als Dauerlicht gegeben nur dann besonders entwicklungsbeschleunigend, wenn gleichzeitig sehr reichlich vor allem mit N gedüngt wird. Die Lampen waren mit weißen oder silberfarbigen Reflektoren versehen. Bei „Schwachlicht“ hatten die Leuchtstoffröhren eine Leistungsaufnahme von 65 W pro m². Diese Intensität reicht als Dauerlicht gegeben zu langsamem Wachstum vollständig aus, wenn die Pflanzen im Starklicht einen guten Start bekommen hatten. Mehrtägiger Kurztag, dessen Lichtperiode von der gerade herrschenden Tageslänge abwich, wurde den Pflanzen im Keller des Instituts in einem gut wärmeisolierten Raum geboten, der mit Hilfe eines starken Ventilators Frischluft erhielt. Die Heizung erfolgte durch die Vorschaltgeräte der Leuchtstoffröhren (Zusatzheizung war nur bei starkem Frost notwendig), die Kühlung durch den Kontaktthermometergesteuerten Ventilator, aber nicht unter die Temperatur der Außenluft. Während der kühleren Jahreszeit blieb die Temperatur innerhalb eines Bereiches von 3° um 18° konstant. Sie stieg im Sommer wie im Gewächshaus bis zu 35° an.

Bei Versuchen zur endogenen Rhythmik wurden die Pflanzen unter Dauerlicht gehalten und vor Beginn der Dunkelzeiten in Hartfaserkästen gebracht, in denen je 1 Leuchtstoffröhre zur gewünschten Zeit mit Hilfe einer Schaltuhr aus- und wieder eingeschaltet wurde. Da die Vorschaltgeräte außerhalb der Kästen angebracht waren, erübrigte sich eine besondere Kühlung dieser Kammern.

Zur Korrelierung von vegetativer Entwicklung und Geschlechtsausprägung mußten Blattflächen bestimmt werden. Da genaue Messungen an den stark zerteilten Blättern zu zeitraubend gewesen wären, wurde die Fläche jedes Blattes aus 3 schnell bestimmbaren Werten errechnet: der Länge und der Breite des Mittelblättchens und der Zahl der Blättchen des Blattes. Jedes Blättchen ist angenähert ein Rhombos, die Multiplikation der gemessenen Diagonalen ergibt ein mit einem konstanten Faktor belastetes Flächenmaß für das Mittelblättchen. Da nur relative Werte interessieren, kann dieser Faktor vernachlässigt werden. Zur Blattfläche tragen ebenfalls die rhombischen Seitenblättchen bei. Ihre Fläche steht in einem bestimmten Verhältnis zur Fläche des Mittelblättchens, wenn man ihre Zahl berücksichtigt. Die Unterscheidung von 3-, 5- und 7-Blättchen-Blättern schien noch nicht fein genug, darum wurde unterschieden zwischen Blättern mit 1 + 2 oder 3 Blättchen, 3 + 2 oder 5 Blättchen, 5 + 2 oder 7 Blättchen. Diese Unterscheidung dient zur Trennung der echten z. B. 5-Blättchen-Blätter von Blättern mit 3 größeren Blättchen und 2 Randblättchen, die je nicht mehr als $^1/_5$ der Fläche des Mittelblättchens besitzen. Entsprechend der Zahl der Blättchen muß das Längen-Breiten-Produkt des Mittelblättchens mit einem bestimmten Faktor multipliziert werden. Diese Faktoren wurden folgendermaßen festgelegt: Aus einem Bestand wurden willkürlich eine Anzahl Blätter entnommen und ihre sämtlichen Blättchen nach Länge und Breite gemessen. Die Längen-Breiten-Produkte je zweier entsprechender Seitenblättchen eines Blattes wurden dann in Beziehung zum Produkt seines Mittelblättchens gesetzt. Folgende Mittelwerte ergeben sich (Tabelle 1).

Tabelle 1

Blättchenzahl	1	1 + 2	3	3 + 2	5	5 + 2	7
Zahl der gemessenen Blätter			13	48	25	16	1
Produkt des							
Mittelblättchens	1	1	1	1	1	1	1
benachbarten Blättchenpaares	—	—	1,13	1,16	1,37	1,50	1,60
benachbarten Blättchenpaares	—	—	—	0,23	0,51	0,85	1,14
benachbarten Blättchenpaares	—	—	—	—	—	0,16	0,40
Summe	1		2,13	2,39	2,88	3,51	4,14
Abgerundet	1	1,2	2,1	2,4	2,9	3,5	4,1

Die Zahlen der letzten Zeile vorstehender Tabelle stellen die Faktoren dar, mit denen das Längen-Breiten-Produkt des Mittelblättchens multipliziert werden muß, um die relative Fläche des Blattes zu errechnen. 1 + 2 Blätter treten sehr selten auf, ebenso echte 7-Blättchen-Blätter. Der Fehler, der sich aus der Ungenauigkeit der betreffenden Rechenfaktoren ergibt, ist daher bedeutungslos.

Experimenteller Teil

1. *Die photoperiodische Reaktion des Hanfes*

Der Hanf gehört zu den Kurztagspflanzen, da er um so schneller zur Blüte kommt, je kürzer der Tag ist. Er besitzt qualitative Kurztagsrassen mit einer oberen kritischen Tageslänge und quantitative, die

auch im Dauerlicht noch zur Blüte kommen. Die 6 untersuchten Sorten blühen bei gleichzeitiger Aussaat und unter gleichen Bedingungen stets (d. h. wenn der Tag nicht wesentlich kürzer als 12 Std ist) in folgender Reihenfolge auf:

$$\left.\begin{matrix} F \\ B \\ S \end{matrix}\right\} \text{gleichzeitig} \; —C—P—I$$

Als Beispiel siehe die Abb. 1 bei KÖHLER (1960). Eine frühe Sorte erhält also unter gleichen Bedingungen einen stärkeren Blühimpuls als eine spätere.

Der Pelozellahanf und der indische Hanf sind qualitative Kurztagspflanzen, sie blühen bei uns erst im Spätsommer oder Herbst, wenn der

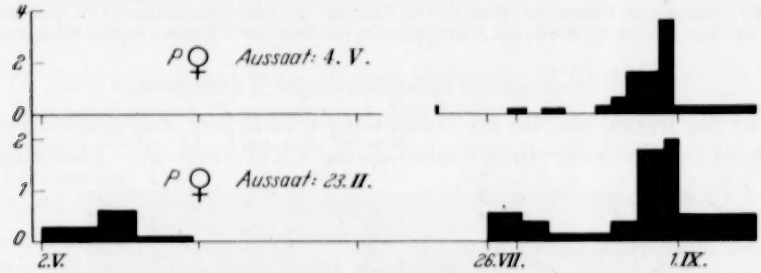


Abb. 1. Blühtermine der Weibchen der Sorte Pelozella nach Aussaat im Abstand von 10 Wochen (23. II. und 4. V). Ein Teil der früh ausgesäten Pflanzen blühte, bevor der natürliche Tag die kritische Länge überschritten hatte. Ordinate: Aufblühende Pflanzen/Tag

Tag eine bestimmte Länge unterschritten hat. Sät man Pelozellahanf zu Beginn und am Ende des Frühjahrs aus, so kommen die Pflanzen beider Aussaaten doch zur gleichen Zeit Ende des Sommers zur Blüte, soweit die früh ausgesäten nicht bereits im Frühjahrskurztag einen ausreichenden Blühimpuls erhalten hatten (Abb. 1). Ein gerade unterschwelliger Blühimpuls, wie ihn die früh ausgesäten spätblühenden Pflanzen gehabt haben müssen, bleibt also in überkritischer Tageslänge völlig unwirksam. Hieraus und aus der Tatsache, daß genetisch frühe Pflanzen unter gleichen Bedingungen einen stärkeren Blühimpuls erhalten als spätere, folgt, daß der qualitative vom quantitativen Kurztagshanf sehr schnell durch steigende Tageslänge zu trennen sein muß.

Schurig- und Pelozellahanf wurden am 14. 2. ausgesät und im natürlichen Tag gehalten. Ab. 27. 2. erhielten sie 16 Std-Tag, ab 13. 3. 18 Std-Tag, ab 20. 3. 20 Std-Tag und ab 3. 4. Dauerlicht. Die Blühtermine zeigt die Abb. 2. Sämtliche Schurig-Hänfe blühten im Dauerlicht, aber von den Pelozellapflanzen hatte keine einzige im anfänglichen Kurztag einen ausreichenden Blühimpuls erhalten. Sie bedurften einer besonderen Blühinduktion im 11- oder 16stündigen Kurztag (s. die Bezeichnung an den Kurven). Der jeweilige Kurztagsbeginn ist durch

den Fußpunkt der Kurven gekennzeichnet. Die im Dauerlicht verbliebenen Pelozellapflanzen blieben bis Versuchsende im September vegetativ.

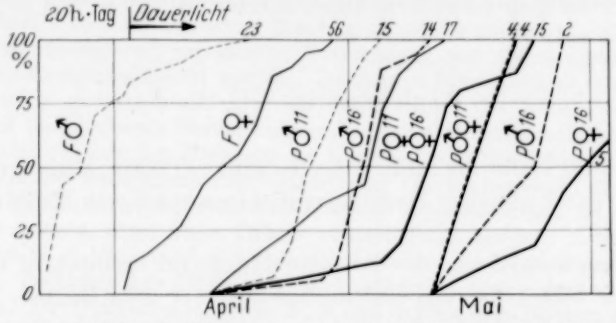


Abb. 2. Prozentsätze blühender Pflanzen von Schurig- (*F*) und Pelozellahanf (*P*). Erklärung im Text. Die Zahlen am Ende der Kurven geben die Zahl der Pflanzen in den Gruppen an

2. *Die Summation unterschwelliger Kurztagsreize*

Der im Dauerlicht bis zu vollständiger Blühreife angezogene Pelozellahanf erhält erst durch mindestens 8 Kurztage mit 12stündiger

Abb. 3. Stärke des Blühimpulses in Abhängigkeit von der Zahl der Kurztage. Die beiden linken Männchen hatten 8, die mittleren 11, die rechten 14 Kurztage erhalten

Dunkelzeit, die ohne Unterbrechung aufeinanderfolgen, einen gerade erkennbaren Blühimpuls (Abb. 3). Bei ihm wie bei jeder anderen Kurztagspflanze, die mehr als einen Kurztag braucht, um blühen zu können,

müssen sich die unterschwelligen Blühimpulse einzelner Kurztage zu einem Gesamtimpuls addieren. Sie summieren sich (wie CARR 1955 gezeigt hat) auch dann noch, wenn zwischen die Kurztage Tage ohne Dunkelzeit eingeschaltet werden. Beim Hanf kann man die Stärke des photoperiodischen Reizes durch einen Bruch ausdrücken, der im Zähler die Zahl der Kurztage, im Nenner die Zahl der Tage des Cyclus insgesamt enthält.

Pelozellahanf erhielt 8 Tage nach der Aussaat gruppenweise folgende Behandlung (K = 12 Std-Kurztag, L = Dauerlichttag; Tag = 24 Std):

1 K + 1 L 1 K + 2 L 1 K + 3 L 1 K + 5 L 1 K + 8 L
1 K + 12 L 2 K + 5 L 2 K + 12 L

der photoperiodische Reizwert ist demnach:

$^1/_2$ $^1/_3$ $^1/_4$ $^1/_6$ $^1/_9$ $^1/_{13}$ $^2/_7$ $^1/_7$.

In Abb. 4 sind die Prozentsätze blühender Weibchen am 50. und 59. Tag nach dem 1. Kurztag über dem Logarithmus der Reizwerte eingetragen. Vom 61. Tag ab wurde Dauerkurztag gegeben, um das Geschlecht der noch nicht blühenden Pflanzen feststellen zu können. Die Werte liegen ungefähr auf einer Geraden. Das bedeutet, daß auch der mittlere Blühtermin vom log des photoperiodischen Reizwertes linear abhängig sein muß.

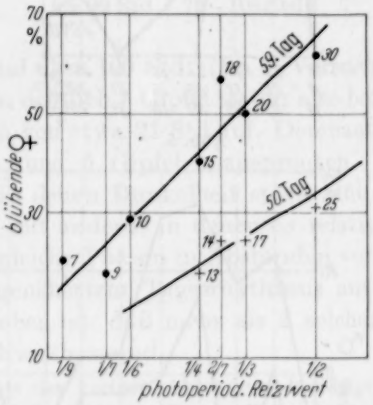


Abb. 4. Prozentsätze blühender Pelozellaweibchen in Abhängigkeit vom Blühreizwert am 50. und 59. Tag nach dem 1. Kurztag. Die Abszisse ist logarithmisch, die Ordinate nach dem Gaußschen Integral geteilt

Dieses Darstellungsverfahren hat den großen Vorzug, daß es ohne Mittelwerte auskommt. Mittelwerte müssen aus sämtlichen Werten gebildet werden. Das Abwarten der Blühtermine aller Pflanzen in den Gruppen mit dem schwächsten Blühimpuls hätte aber den Abschluß des Versuchs noch um Monate verzögert.

Der Versuch zeigt, daß sich noch Kurztagsreize summieren, die im Abstand von über einer Woche aufeinander folgen. Darüber hinaus zeigt ein Vergleich der Werte am 50. und 59. Tag, daß für den gleichen Blühimpuls um so weniger Kurztage erforderlich sind, je mehr Dauerlichttage dazwischen geschaltet sind. In Abb. 4 ist neben den Punkten jeweils die Zahl der dunklen Nächte, die die Pflanzen bisher erhalten hatten, vermerkt. Um 30 % der Weibchen blühen zu lassen, genügten der Gruppe 1 K + 5 L 10 Kurztage; die Gruppe 1 K + 1 L benötigte dazu 25 Kurztage.

Ein völlig entsprechendes Ergebnis hatte CARR bei *Chenopodium amaranticolor* erzielt, aber — wohl unter dem Eindruck anderer

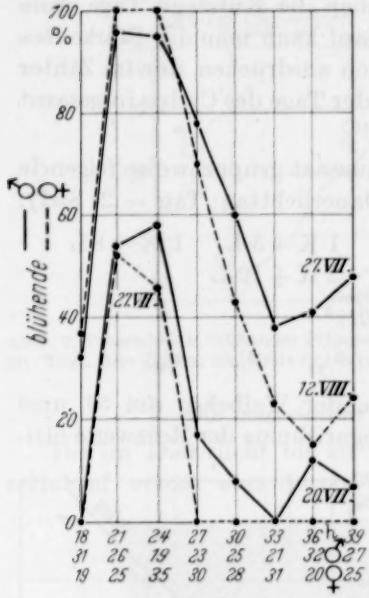


Abb. 5

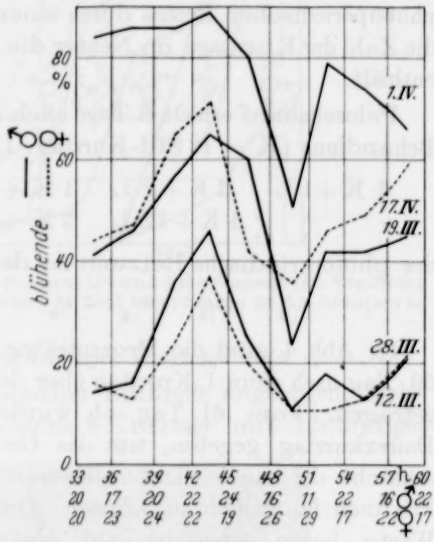


Abb. 6

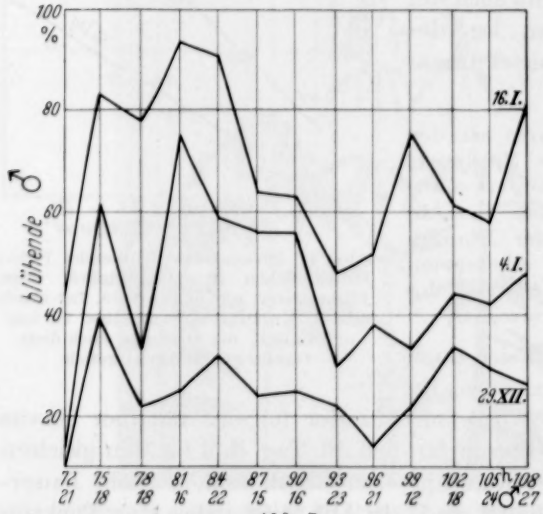


Abb. 7

Ergebnisse — gerade auf Induktionsverlust durch Zwischenschaltung von Langtagen geschlossen.

Abb. 5—7. Blühimpuls als Funktion der Länge der Licht-Dunkelcyclen. Abszisse: Cyclenlängen, darunter die Zahlen der in den Gruppen enthaltenen Pflanzen. Ordinate: Blühende Pflanzen in Prozent. Die Kurven verbinden die Werte an gleichen Tagen. Die Kurven der Abb. 6 sind durch Zusammenfassung je zweier benachbarter Werte geglättet. Abb. 6: Pelozellahanf; Abb. 5 und 7: Carmagnolahanf. ♀ --------; ♂ ————

3. *Photoperiodismus und endonome Rhythmik*

Die Tatsache, daß sich die Reize einzelner durch mehrere Tage Dauerlicht getrennter Dunkelzeiten noch blühfördernd auswirken,

erlaubt eine Nachprüfung der Theorie von BÜNNING (1946) über den Zusammenhang zwischen photoperiodischer Reaktion und endonomer Rhythmik. Dazu wurden Pflanzen stets gleichen Rhythmen von Licht und Dunkel ausgesetzt und ihre Blühtermine festgestellt. Drei Versuche wurden angestellt (Tabelle 2).

Die Dunkelperioden dauerten einheitlich 9 Std. Trägt man die prozentualen Anteile der blühenden Pflanzen, jeweils auf die in den Gruppen enthaltenen Männchen oder Weibchen bezogen, an bestimmten Tagen als Funktion der Cycluslänge auf, dann stellt man fest, daß bestimmte Cycluslängen gegenüber anderen deutlich blühfördernd gewirkt hatten. Im 1. Versuch lag der Gipfel zwischen 21 und 24 Std, im 2. zwischen

Tabelle 2

Sorte	Aussaat	1. Dunkelzeit	Lichtdauer	Cycluslängen	Abb.
1. Carmagnola	13. 6.	9. 7.	9, 12, 15 ... bis 30 Std	18—39 Std	5
2. Pelozella .	15. 1.	28. 1.	24, 27 ... bis 51 Std	33—60 Std	6
3. Carmagnola	27. 10.	9. 12.	63, 66 ... bis 99 Std	72—108 Std	7

42 und 45 Std und im 3. bei über 80 und über 100 Std. (Im 3. Versuch war die Rhythmik nur bei den Männchen deutlich.) Gipfel traten also bei Cyclenlängen von ganzzahlig Vielfachen von etwa 21 Std auf. Demnach sind die Gipfel des 3. Versuchs als 4. und 5. Gipfel anzusprechen.

Die Versuche zeigen, daß Phasen, in denen Dunkelheit stark blühfördernd wirkt (= skotophile Phasen) mit andern, in denen es relativ hemmend wirkt, abwechseln, und daß gleiche Phasen in Abständen von etwas weniger als 24 Std, also in angenähertem Tagesrhythmus aufeinander folgen. Besonders hervorzuheben ist, daß mehr als 2 solcher Cyclen der endonomen Rhythmik nachweisbar sind.

Durch diese Versuche wird das Ergebnis des vorigen Abschnitts bestätigt, daß Dunkelzeiten um so stärker blühfördernd wirken, je länger die zwischengeschaltete Lichtzeit ist. Im 2. Versuch blühten z. B. am 17. 4. nach insgesamt 32 bis 34 Dunkelperioden in einer Cycluslänge von 57—60 Std 59% der Weibchen, während nach der gleichen Cycluszahl in einer Cycluslänge von 42—45 Std am 28. 3. nur 37% der Weibchen blühten.

4. Tageslänge und vegetative Entwicklung

Die Kotyledonen und Primärblätter des Hanfes sind ungeteilt, die Folgeblätter werden in zunehmendem Maße fingerförmig geteilt. Zunächst entstehen 3-, dann 5- und schließlich 7-fingerige Blätter. Die Aufteilung der Blätter wird begleitet von einer zunehmenden Verschmälerung der Teilblättchen, deren Ränder immer stärker gezähnt werden. Das Maximum der Blattfläche liegt an der Basis der Blütenregion. In dieser nimmt die Blattfläche von unten nach oben ab.

SCHAFFNER (1926/28) beobachtete, daß blühende Pflanzen, die aus Kurztag in Dauerlicht übertragen worden waren, an ihrer Spitze neue Blätter ausbildeten, die primärblattartig, aber sehr groß waren. Da mit diesen „Primärblättern 2. Art" auf der Pflanze ein vollständiger 2. Entwicklungscyclus begann, nannte SCHAFFNER die Pflanzen „rejuvenated". Mit der Verjüngung stellten die Pflanzen das Blühen ein, sie mußten erst wieder in Kurztag übertragen werden, um eine weitere Blühperiode zu erleben; demnach handelte es sich um qualitative Kurztagspflanzen. SCHAFFNER erzielte 4 Blühperioden und Verjüngungen an denselben Pflanzen; damit gelang ihm wohl als erstem die Umwandlung einer hapaxanthen Pflanze zur pollacanthen.

Die Verjüngung wurde mit folgendem Ergebnis eingehender untersucht (vgl. KÖHLER 1958a):

1. Die ansteigende Blattfolge (zunehmende Teilung und Vergrößerung der Blätter) erreicht bei qualitativen Kurztagspflanzen in überkritischer Tageslänge einen Endwert; die Pflanzen bilden dann ständig gleiche Blätter aus.

2. Nach Beginn der Blüte (bei qualitativen Kurztagpflanzen also nur im Kurztag) findet eine Umstimmung des Spitzenmeristems statt, es legt in sehr schneller Folge zunehmend einfachere Blätter an, die letzten sind ungeteilt.

3. Während der Blüte werden die noch vor und nach Beginn der Blüte angelegten Blätter nicht mehr voll entfaltet, sie bleiben um so kleiner, je jünger sie sind. Die letzten Blätter einer Pflanze, die in der blühinduzierenden Tageslänge oder einer kürzeren verblieb, sind nur millimetergroß. Die Baustoffe werden nur noch zur Ausbildung der Reproduktionsorgane verwendet. Mangels Assimilationsfläche stirbt die Pflanze nach der Blüte oder Fruchtreife ab.

4. Wird die Tageslänge nach Beginn der Blüte ausreichend erhöht, dann wachsen die noch wachstumsfähigen, schon formdeterminierten Blätter heran. Auf diese Weise erlangen die letzten, während der Blüte ungeteilt angelegten Blätter eine Größe, die das Vielfache der normalen Primärblattgröße betragen kann.

5. Durch die Verlängerung des Tages scheint gleichzeitig die Blühintensität verringert, da im Bereich ungeteilter Blätter (Primärblätter zweiter Art) relativ wenige Blüten angelegt sind. Dies beruht einmal darauf, daß in dieser Region keine Achselsprosse mehr angelegt wurden, andererseits darauf, daß sich die Blüten im Bereich der jetzt vergrößerten Blätter durch Internodienstreckung weiter voneinander entfernten.

6. Frühe und späte Typen lassen sich gleich gut verjüngen. Das Leben der frühen wird jedoch, verglichen mit von Anfang an in der verjüngenden Tageslänge aufgewachsenen Pflanzen, nicht wesentlich verlängert.

Für die Fragestellung dieser Arbeit haben die vorstehenden Punkte folgende Bedeutung: Als Folge der Induktion tritt eine Umstimmung des Spitzenmeristems ein. Es legt einen vollständigen Blütenstand mit Blüten und vegetativen Organen an (Bereicherungszweige) und stellt dann seine Tätigkeit ein. Ist der Blütenstand fertig determiniert, was offenbar in wenigen Tagen geschieht, dann können nachträgliche Veränderungen der Tageslänge nur noch quantitativen Einfluß auf die Entfaltung der angelegten Organe nehmen. Längerer Tag nach Beginn der Blüte bewirkt eine Vergrößerung der Blätter und Internodien, aber

zunächst noch keine Neuanlage von Organen. Das macht verständlich, warum die Verjüngung bei qualitativen und quantitativen Kurztagspflanzen ganz gleich vor sich geht.

Verjüngte Pflanzen sind im Aufbau den Männchen ähnlich. Sie sind identisch mit den „lockeren" Typen v. Sengbuschs (vgl. Abschnitt Genetik).

5. *Licht und Geschlechtsausprägung*

Die beschriebenen Wirkungen des Lichtes, insbesondere der Photoperiode, auf die Wuchsform und die Intensität der Reproduktion lassen eine entsprechende Beeinflussung der Geschlechtsausprägung erwarten. Soweit bisher bekannt, sind Weibchen in dieser Hinsicht am wenigsten modifizierbar. Männchen sind seit den Untersuchungen Schaffners (1921/23/31) als sehr labil bekannt. Wachsen sie in einer Tageslänge auf, die viel kürzer als die Normaltageslänge ist — worunter die Tageslänge verstanden werden soll, die während der Vegetationsperiode der betreffenden Sorte in deren Heimat herrscht — dann bilden die Männchen intersexe und weibliche Blüten aus. Einheimische Sorten sind also rein weiblich, wenn man sie im Winter im Gewächshaus ohne Zusatzlicht anzieht. Entsprechendes gilt auch für monöcische Sorten. Während sie im Sommer im Freiland fast nur Monöcisten enthalten, entstehen im Winter im Gewächshaus nahezu ausnahmslos Weibchen (Huhnke, Jordan, Neuer und v. Sengbusch (1951). Diese Weibchen unterscheiden sich von unter gleichen Bedingungen aufgewachsenen Weibchen diöcischer Sorten mit gleicher photoperiodischer Reaktion nicht. Dagegen sind die Weibchen, die an Stelle von Männchen aus Saatgut diöcischer Sorten entstanden sind, meist noch deutlich am (zwar verweiblichten) männlichen Habitus von echten Weibchen zu unterscheiden.

Nach Borthwick und Scully (1954) entstehen aus „Weibchensaat", die aus Selbstung von Subgynöcisten gewonnen wurde, um so mehr Monöcisten, in je kürzeren Tag die Pflanzen nach Anzucht im Langtag gebracht werden. Dies braucht kein Widerspruch zur zitierten Feststellung zu sein, daß Kurztag verweiblicht. Man muß berücksichtigen, daß diese Autoren eine Hanfrasse verwendeten, die sich photoperiodisch ganz anders verhielt; es ist eine qualitative Kurztagrasse, die etwa unserer Pelozella gleicht. Wie wichtig die photoperiodische Reaktion für die Geschlechtsausprägung ist, kann an folgendem Beispiel gezeigt werden, das nicht näher ausgeführt werden soll: Bei Anzucht von Pelozella- und Schurig-Hanf im 14 Std-Tag trugen fast sämtliche Männchen des Schurig-Hanfes weibliche oder intersexe Blüten, von den später aufblühenden Männchen der Pelozella kein einziges!

Ein erster Versuch über die Abhängigkeit der Geschlechtsausprägung der Monöcisten von der Photoperiode wurde folgendermaßen ausgeführt: Monöcisten wurden ab 16. XII. im Dauerlicht in 7er-Töpfen angezogen.

Vom 13. II. an kamen alle Pflanzen (bis auf eine Kontrollgruppe von 10 Pflanzen) in 12stündigen Kurztag und blieben dort 1, 2, 3, 5, 7 usw. Tage; anschließend wurden sie wieder in Dauerlicht übertragen. An drei Terminen wurden die stäubenden männlichen Blüten an der Hauptachse gezählt. Die 3 Kurven der Abb. 8 verbinden die Summen der bis zu den drei angegebenen Terminen insgesamt geöffneten männlichen Blüten.

Sieht man zunächst von den ersten drei Punkten der Kurven ab, dann scheint die Länge der Kurztagbehandlung für die Geschlechtsaus-

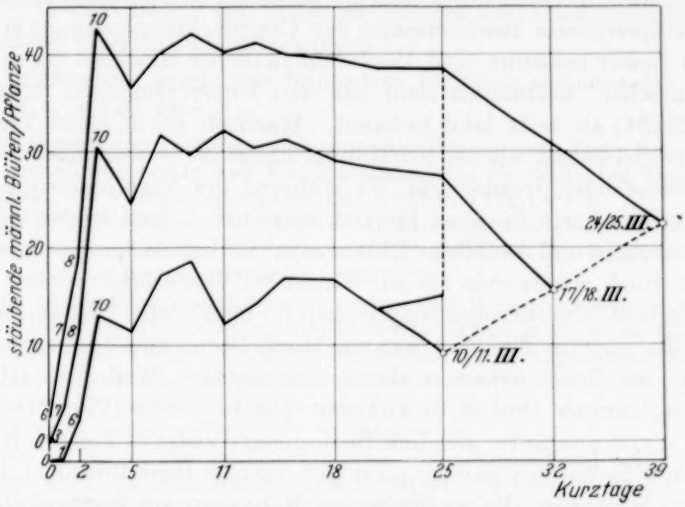


Abb. 8. Die Abhängigkeit der Geschlechtsausprägung bei frühen Monöcisten von der Zahl der Kurztage nach Anzucht im Dauerlicht. (Anmerkung bei der Korrektur: Die Kurvenpunkte mit Ordinatenwerten > 8 sind versehentlich um 2 Einheiten zu niedrig eingezeichnet)

prägung nahezu gleichgültig gewesen zu sein. Die (wie später bewiesen wird, reproduzierbare) Abnahme der Zahl der männlichen Blüten mit steigenden Zahlen von Kurztagen fällt kaum ins Gewicht. Wenn die Geschlechtsausprägung also überhaupt stärker variabel ist, dann kann sie fast nur von der Photoperiode abhängig sein, die *vor* Beginn der Blüte herrschte.

Daß in den Gruppen mit 0—2 Kurztagen so viel weniger männliche Blüten stäubten, beruht zu einem Teil darauf, daß ohne den induktiven Kurztag das Aufblühen langsam und ungleichmäßig erfolgte (neben den Punkten am aufsteigenden Ast der Kurve ist jeweils die Zahl der stäubenden Pflanzen vermerkt). Ob sich der vordere Ast der Kurve bei Zählung an späteren Terminen noch der Höhe der anderen Werte angeglichen hätte, konnte nicht festgestellt werden, da der Versuch abgebrochen werden mußte. Es ist aber aus später zu besprechenden Gründen unwahrscheinlich.

Das Ergebnis der Unabhängigkeit der Geschlechtsausprägung von der nach der Blühauslösung herrschenden Tageslänge steht in voller Übereinstimmung zur Folgerung des vorigen Abschnitts, daß während der Induktion in kurzer Zeit ein fertiger Blütenstand gebildet wird, dessen Anlagen durch die Nachbehandlung qualitativ nicht mehr verändert werden.

Zur Überprüfung der erschlossenen Wirkung der präinduktiven Tageslänge und gleichzeitig zur Untersuchung, wieweit der Tageslängeneffekt auf die Geschlechtsausprägung ein Lichtmengeneffekt ist, wurde der folgende Versuch durchgeführt:

Nachbau der Sorte Bernburger Einhäusiger wurde ab 6. XI. unter Dauerlicht herangezogen. Am 26. XI. kamen die Pflanzen in drei verschiedene Lichtbedingungen:

D = Dauerlicht, „Starklicht"
S = Dauerlicht, „Schwachlicht"
K = 13stündiger Kurztag, Starklicht

Am 17. XII. und am 8. I. wurden aus jeder Bedingung jeweils ein Drittel der Pflanzen in die eine, ein Drittel in die andere abweichende Bedingung übertragen, während das letzte Drittel weiterhin in der bisherigen Beleuchtung verblieb. Insgesamt entstanden so 27 Gruppen mit je 9 (8) Pflanzen, die nach ihrer Behandlung bezeichnet wurden: KDS ist die Gruppe, die zuerst Kurztag, ab 17. XII. Dauerstarklicht und ab 8. I. Dauerschwachlicht erhielt. Während und am Ende dieser 9 Wochen wurden laufend die Blüten an der Hauptachse registriert. Sobald die Primärblätter einer Pflanze während des Versuchs vergilbten, wurde diese Pflanze in einen größeren Topf (10 cm Durchmesser) umgesetzt. Nach dem 29. I. wurden die Pflanzen zur Blattmessung entblättert.

Die Geschlechtsausprägung wird ähnlich beurteilt wie der Monöciegrad (KÖHLER 1958b). Jeder Blütenort (je einer links und rechts neben jeder Blattachsel an der Hauptachse) erhält den Wert 1, wenn er von mindestens einer männlichen Blüte besetzt ist, $^1/_2$, wenn er eine intersexe Blüte trägt, 0 mit weiblicher Blüte. Die Werte gleicher Blütenörter der Pflanzen einer Gruppe werden addiert und diese Summen wiederum von den untersten Knoten angefangen addiert. Jede Gruppe hat, wenn man die Summen gegen die Blattachseln aufträgt, eine bestimmte Summenkurve, die über die Verteilung der Blüten Auskunft gibt.

Da nicht vorhandene und weiblich besetzte Blütenörter gleich (mit 0) beurteilt werden, ist die Summierung wegen der Streuung der Gesamtblattzahl innerhalb der Gruppe nur dann korrekt, wenn sicher beurteilt werden kann, daß in den oberen vorhandenen Blattachseln keine männlichen Blüten mehr ausgebildet werden; das ist erst dann der Fall, wenn dort einige normale weibliche Blüten gebildet sind. In den Gruppen, die keinen Kurztag erhalten hatten, war bei Versuchsende erst ein Teil der

Pflanzen soweit erblüht, daß das Geschlecht der Blüten in den obersten Blattachseln beobachtet werden konnte. In der folgenden Zusammenstellung (Tabelle 3) der Gesamtzahlen männlich besetzter Blütenörter fehlen die Gruppen SSS bis DDD daher.

Tabelle 3. *Zahl der Blütenörter an der Hauptachse mit männlichen Blüten (Summe von je 9 Pflanzen)*

Beleuchtung in der	Kurztag			Schwaches Dauerlicht			Starkes Dauerlicht		
1. Periode	K1			S1			D1		
2. Periode	K2	S2	D2	K2	S2	D2	K2	S2	D2
3. Periode									
K3	7,5	18	43	72,5	136	171	162	220	191,5
S3	4	10,5	18,5	91,5			145,5		
D3	0	0	12,5	109,5			175,5		

Aus der Tabelle 3 läßt sich folgendes ablesen: Für den Blüherfolg ausschlaggebend ist die Beleuchtung in den 3 Wochen der *ersten* Behandlungsperiode. Die Pflanzen im anfänglichen Kurztag (K1) haben durchweg niedrigere Werte als im Dauerlicht. Schwachlicht (S1) hat eine geringere Wirkung als Starklicht (D1). Sie liegt etwa intermediär zwischen der Kurtag- und Starklichtwirkung. Demnach ist zumindest ein Teil der Kurztagswirkung eine Folge der kleineren Lichtmenge. Der Lichtgenuß in der zweiten und dritten Periode spielt eine relativ so geringe Rolle, daß sich nur in einem Fall eine Überschneidung der drei Hauptgruppen mit gleicher Erstbehandlung ergibt (SDK liegt höher als DKK). Langtagsnachbehandlung im Anschluß an die erste Kurztagsbehandlung bewirkt wie im vorigen Versuch eine Zunahme der Zahl der Blütenörter mit männlichen Blüten (vgl. unter K1 alle 3 Zeilen von links nach rechts, und unter S1 die linke Kolumne). Dies scheint nicht mehr zu gelten, wenn in der ersten Behandlungszeit Stark-Dauerlicht gegeben wurde (unter D1 linke Kolumne). In diesem Fall war die Wirkung der auf den Kurztag folgenden Behandlung einheitlich.

Diese Ergebnisse sollen nun mit den Ergebnissen der Blattflächenmessungen an denselben Pflanzen verglichen werden.

6. Geschlechtsausprägung in Abhängigkeit von der vorherigen vegetativen Entwicklung

Mit Hilfe der im Abschnitt Methode errechneten Faktoren wurde die Fläche sämtlicher Blätter der Pflanzen des eben beschriebenen Versuchs ausgerechnet. Zur Mittelwertbildung innerhalb der Gruppen werden Blätter mit gleicher Insertionsziffer zusammengefaßt. Wenn die Blätter an unteren Knoten schon abgeworfen waren, wurde die Flächensumme

durch die Zahl der tatsächlich vorhandenen Blätter geteilt. Da Primärblätter fast durchweg fehlten und auch das nächste Blattpaar in manchen Gruppen zur Zeit der Messung schon abgeworfen worden war, wurden diese beiden Blattpaare überhaupt nicht berücksichtigt. An der Sproßspitze — im Gegensatz zur Basis — wurde die Flächensumme nicht auf die Zahl der vorhandenen Blätter, sondern auf die Zahl der Pflanzen in dieser Gruppe bezogen. Dies sollte die Variabilität der Blattzahl berücksichtigen. Hatten mehr als die Hälfte der Pflanzen einer Gruppe gar keine Blätter mit einer bestimmten hohen Insertionszahl mehr gebildet, so wurde auch die Fläche der wenigen vorhandenen Blätter nicht mehr gewertet. Die Mittelwerte der Blattflächen jeder Insertion wurden addiert und geben die durchschnittliche Gesamtblattfläche der Gruppe. Diese Flächen sind in der folgenden Zusammenstellung (Tabelle 4) so wie die Blütensummen auf S. 162 angeordnet. Die in runde Klammern gesetzten Zahlen bezeichnen die Nummer des obersten gewerteten Blattes.

Tabelle 4. *Gesamtfläche und Zahl der gewerteten Blätter (in Klammern)*

1. Periode	K 1			S 1			D 1		
2. Periode	K 2	S 2	D 2	K 2	S 2	D 2	K 2	S 2	D 2
3. Periode									
K 3	1097 (15)	1590 (19)	3472 (27)	2230 (18)	4131 (23)	5522 (26)	4141 (23)	6318 (26)	7498 (24)
S 3	1499 (16)	2779 (18)	3619 (20)	2863 (20)	8138 (19)	6408 (18)	4059 (24)	—	9107 (23)
D 3	1268 (16)	1874 (14)	3395 (18)	3052 (20)	3851 (14)	5934 (18)	4051 (23)	—	—

Setzt man nun die Zahlen männlich besetzter Blütenörter zu den Flächensummen in Beziehung, so ergibt sich folgendes:

1. Es besteht eine geradlinige Korrelation zwischen der Zahl der männlich besetzten Blütenörter an der Hauptachse und dem Logarithmus der Blattfläche bei allen Gruppen, die nach Kurztag nicht mehr in Dauerlicht übertragen worden waren (Abb. 9). Der Verlauf der Geraden lehrt, daß zur Ausbildung männlicher Blüten vorher (!) eine bestimmte Mindestblattfläche überschritten sein muß.

2. Die Blattfläche ist im gleichen Sinn wie die Zahl der männlich besetzten Blütenörter abhängig von der Nachbehandlung. Sie nimmt in der Reihenfolge Kurztag, schwaches, starkes Dauerlicht zu.

3. Eine Differenz zwischen der Wirkung des Lichtes auf die Zahl der männlichen Blüten und die Blattfläche scheint darin zu bestehen, daß die Blattflächen der Gruppen K 1 D 2 zum Teil auch K 1 S 2 höher liegen als die der Gruppen S 1 K 2, während es bezüglich der Blüten umgekehrt ist. Diese Abweichung beruht auf der Verjüngung der

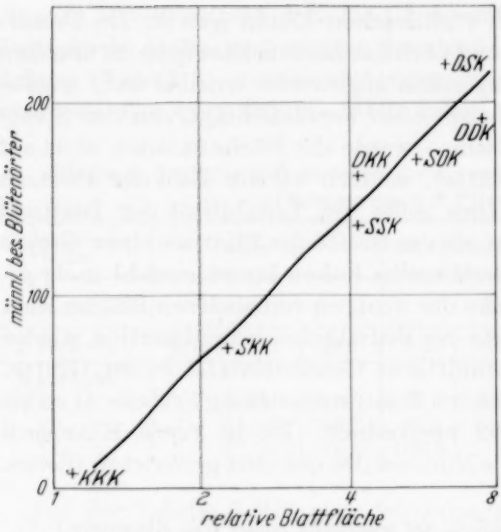


Abb. 9. Die Zahl der mit männlichen Blüten besetzten Blütenörter an der Hauptachse in Abhängigkeit von der Gesamtblattfläche (ohne die Blätter der beiden unteren Knoten)

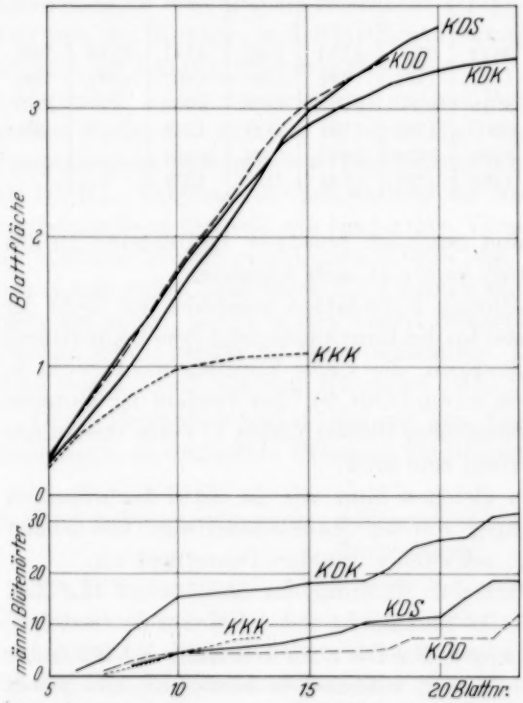


Abb. 10. Summenkurven von Blattflächen (oben) und männlich besetzten Blütenörtern (unten) über der Insertionshöhe = Blattnr.

Pflanzen im Langtag nach anfänglichem Kurztag. Wie im Abschnitt 4 erklärt, wird als Folge des Kurztags in kurzer Zeit ein vollständiger Blütenstand mit Blättern und Blüten angelegt. Wenn die Pflanze anschließend in Langtag kommt, dann kann sich zwar an den Blühverhältnissen wenig ändern, aber die Blätter wachsen heran, worin ja der erste Akt der Verjüngung besteht, und stören dadurch die zunächst vorhandene Korrelation nachträglich. Dies wird besonders deutlich beim Vergleich der Summenkurven der Blattfläche und der männlichen Blüten (Abb. 10). Während die Flächensummenkurve der unverjüngten Gruppe KKK kontinuierlich ansteigt, ebenso wie die Kurven der verjüngten Pflanzen KDK, KDS und KDD, wobei sie natürlich eine sehr unterschiedliche Höhe erreichen, zeigen die Blütensummenkurven der verjüngten Pflanzen einen abgestuften Verlauf. Darin äußert sich, daß die auf Grund der ersten Kurztagbehandlung angelegten weiblichen Blüten nicht verändert werden können (wenn nicht sehr frühzeitig ein neuer Blüh-

impuls gesetzt worden war wie bei KDK), und daß erst die nach der Verjüngung entstandenen Blütenörter wieder entsprechend der vorausgegangenen Tageslänge besetzt werden.

Eine verjüngte Pflanze aus der Gruppe KDK zeigt die Abb. 11. Die Pflanze hat an der Hauptachse nur wenige männliche Blüten angelegt,

a b

Abb. 11a u. b. a Ein verjüngter Monöcist. b Ein Teil derselben Pflanze stärker vergrößert. Man erkennt die Narben der weiblichen Blüten. Im Bereich der gestreckten Internodien tragen die Seitensprosse viele männliche Blüten. An der Hauptachse sind nur an zwei Knoten männliche Blüten vorhanden

dafür aber an den Seitenachsen ziemlich viele. Die Achselsprosse beginnen nämlich ihr Wachstum während der ersten Kurztagbehandlung, wenn das Spitzenmeristem umgestimmt wird, wachsen während des folgenden Langtages heran und werden durch den anschließenden zweiten Kurztag zur Anlegung männlicher Blüten veranlaßt.

Das Hauptergebnis des beschriebenen Versuches ist die völlige Übereinstimmung zwischen der Beblätterung und der Geschlechtsausprägung. Es dürfte kaum zu bezweifeln sein, daß ein kausaler Zusammenhang besteht. Bemerkenswert ist noch, daß die Wirkung der Tageslänge auf

die Blattfläche und als deren Folge auf die Blüte wenigstens großenteils eine Lichtmengenwirkung ist, wie sich aus dem Vergleich der Wirkung schwachen und starken Dauerlichts ergibt. Sie unterscheidet sich also ganz wesentlich von der blühinduzierenden Wirkung der Tageslänge, bei der diese Komponente keine große Rolle spielen soll.

Über diesen indirekten Haupteffekt der Tageslänge auf die Blütenbildung hinaus ergeben sich aber auch Hinweise für eine direkte Tageslängenwirkung auf das Geschlecht, und zwar eine männlichkeitsfördernde Tendenz des Kurztags (bzw. -hemmende des Langtags), wie sie von BORTHWICK und SCULLY (1954) beobachtet wurde.

Schon anläßlich des in Abschnitt 5 anfangs beschriebenen Versuches war bezweifelt worden, daß die Zahl der männlichen Blüten bei fehlender oder ganz kurzer Kurztagsbehandlung die entsprechende Zahl der stärker induzierten Pflanzen erreicht. In diesem Versuch finden sich weniger männliche Blüten bei den Pflanzen, die in der verjüngenden Tageslänge verblieben als bei denen, die wieder in Kurztag übertragen worden waren (s. die Zahlen in den Kolumnen unter K 1 D 2 oder K 1 S 2 in der Tabelle 3 S. 162).

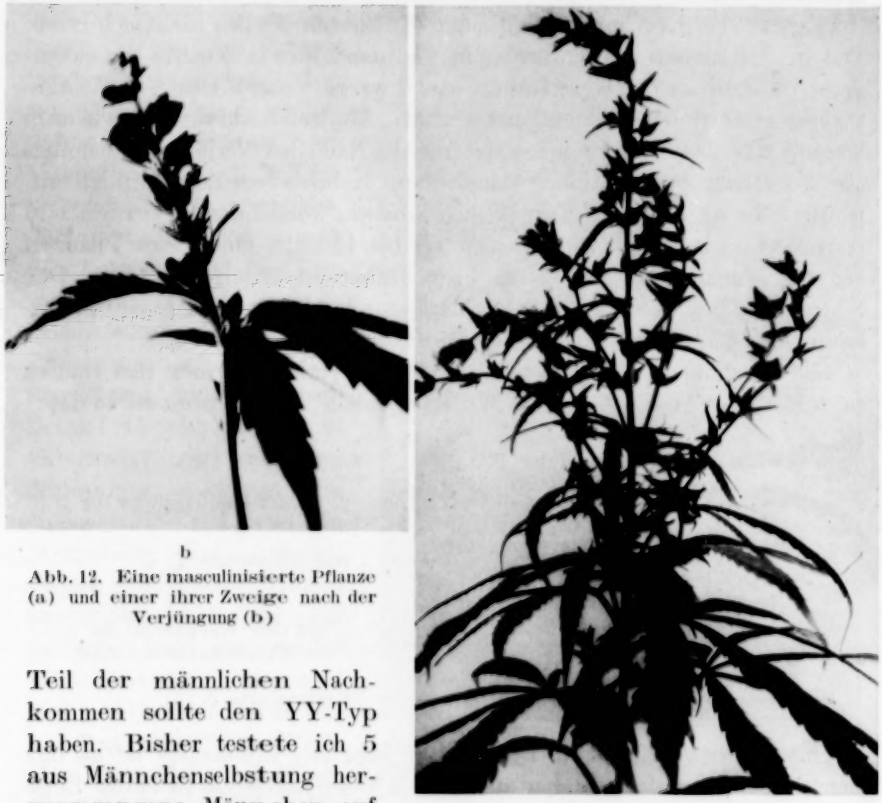
Einen weiteren Anhaltspunkt geben die aus genannten Gründen hier nicht behandelten Gruppen DDD und DDS, wenn man sie mit der Gruppe DDK vergleicht. In der Gruppe DDD ließen 5 Pflanzen oberhalb der männlichen Blüten schon einige weibliche erkennen, sind also sicher zu beurteilen. Sie hatten 10, 11, 14, 10 und 5 Blütenörter mit männlichen Blüten besetzt. Bei zwei Pflanzen mit je 22 männlichen Blütenörtern waren die höheren Positionen noch nicht zu beurteilen, und zwei Pflanzen zeigten noch gar keine Blüten. Insgesamt sind also 44 + 50 männliche Blütenörter schon vorhanden. Es erscheint unwahrscheinlich, daß die beiden Halbblüher und die beiden Nichtblüher noch einmal so viele Blütenörter männlich besetzt hätten (die Kontrollgruppe DDK hatte 191,5 männliche Blütenörter). Bei der Gruppe DDS hatten 5 Pflanzen insgesamt 54,5 männliche Blütenörter und 4 Halbblüher 44,5 Blüten. Die 4 Halbblüher hätten also noch über 90 Blütenörter männlich besetzen müssen. Auf Grund dieser Befunde ist kaum zu bezweifeln, daß auch bei unseren Monöcisten eine direkte männlichkeitsfördernde Wirkung des Kurztags besteht. Es ist nur völlig logisch, daß bei den hier verwendeten Pflanzen, die an einen sommerlichen Langtag angepaßt sind, der hemmende Kurztags- bzw. fördernde Langtagseffekt (= Lichtmengeneffekt) stärker in Erscheinung tritt, dagegen bei den an Kurztag angepaßten Monöcisten, die BORTHWICK und SCULLY für ihre Versuche verwendeten, der echt photoperiodische, direkt fördernde Kurztagseffekt.

7. Zur Genetik des Geschlechts

Für die Geschlechterverteilung im diöcischen Hanf gilt das Correnssche Rückkreuzungsschema. Welches der beiden Geschlechter homozygot ist, welches heterozygot, stellt man durch Selbstung von Subdiöcisten fest. Weibliche Pflanzen mit einigen männlichen Blüten ergeben nach Selbstung stets ihresgleichen oder Weibchen (MCPHEE 1925, HIRATA 1927, BORTHWICK und SCULLY 1954, KÖHLER 1958b). Bei v. SENGBUSCH (1942) traten im monöcischen Hanf einige Männchen auf, doch erklärt er diese Männchen als durch Fremdbestäubung entstanden. Nur

HOFFMANN (1947) findet soviele Männchen in seinen Kreuzungen feminisierter Monöcisten, daß er Fremdbestäubung ausschließen zu können glaubt.

Selbstet man durch sehr kurzen Tag geschlechtlich modifizierte Männchen, so entstehen männliche und weibliche Nachkommen. Ein



b a

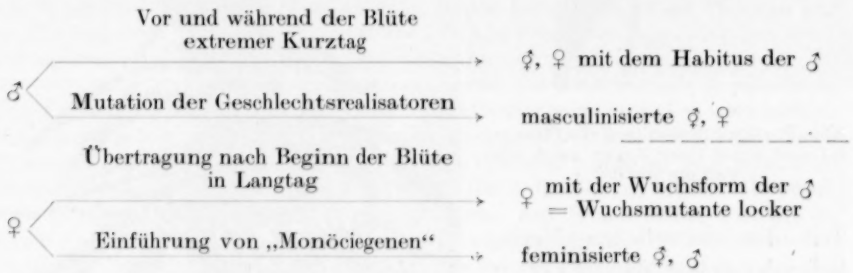
Abb. 12. Eine masculinisierte Pflanze (a) und einer ihrer Zweige nach der Verjüngung (b)

Teil der männlichen Nachkommen sollte den YY-Typ haben. Bisher testete ich 5 aus Männchenselbstung hervorgegangene Männchen auf ihre Vererbung. Die Nachkommen aller 5 spalteten in Männchen und Weibchen auf. Unter diesen 5 Pflanzen befand sich also noch keine mit der Konstitution YY. Ob das Zufall ist, oder ob YY-Zygoten weniger vital sind, müssen weitere Versuche zeigen.

Die Monöcie im weiblichen Habitus ist genetisch bedingt. Zwei autosomale Gene im homozygoten Zustand lassen unter geeigneten Bedingungen einen stark männlichen Monöcisten entstehen (KÖHLER 1958b). Aus der Selbstung eines im Pelozellahanf gefundenen schwach männlichen Monöcisten entstanden Männchen mit dem Habitus der Weibchen. Ihr Vererbungsmechanismus muß noch geklärt werden.

HOFFMANN (1947) berichtete vom Auftreten masculinisierter Typen, also monöcischen und weiblichen Pflanzen mit dem Habitus der Männchen. Ich habe sie zunächst für verjüngte Weibchen und Monöcisten vom weiblichen Habitus gehalten. Dieser Schluß wurde dadurch nahe gelegt, daß die verjüngten Weibchen identisch sind mit der „Wuchsmutante locker" v. SENGBUSCHs, und HOFFMANN annahm, daß die „lockeren" Formen mit seinen masculinisierten Typen identisch seien. Erst in den letzten Jahren traten in meinem Material 3 echte masculinisierte Pflanzen auf. Da sie nahezu steril waren, konnte eine Vererbungsanalyse noch nicht durchgeführt werden. Hinweise auf ihre Entstehung brachte aber das Verjüngungsexperiment. Nach der Verjüngung nahmen alle 3 Pflanzen wieder den männlichen Habitus an und blühten zumindest an einzelnen Zweigen rein männlich, waren dort also nicht von echten Männchen zu unterscheiden. (Abb. 12 zeigt eine dieser Pflanzen vor der Verjüngung und einen ihrer blühenden Zweige nachher.) Der Schluß liegt nahe, daß alle 3 Pflanzen durch Abschwächung des männlichen Geschlechtsrealisators aus Männchen entstanden sind.

Die Beziehungen aller Geschlechts -und Habitusformen des Hanfes zu den echten Männchen und Weibchen stellen sich demnach so dar:



Das Schema zeigt, daß der Habitus sehr viel konstanter ist als das Geschlecht. Man sollte daher den XX-XY-Mechanismus in erster Linie für den Habitus in Anspruch nehmen. Große Schwierigkeiten ergeben sich bei dem gegenteiligen Versuch HOFFMANNs, das Geschlecht als die konstantere Eigenschaft zu betrachten, also gleiche Geschlechtstypen für näher verwandt zu halten, als gleiche Habitusformen. Die wichtigsten Argumente HOFFMANNs für seine Ansicht sind folgende: 1. Das Auftreten von Männchen im monöcischen Hanf. Es wurde bereits gezeigt, daß dieses Ergebnis HOFFMANNs von keiner Seite bestätigt wurde. 2. Die Abweichungen vom erwarteten 1:1 Spaltungsverhältnis nach der Kreuzung von Weibchen und feminisierten Typen mit Männchen. Als Ursache für diese Abweichungen kommen neben genetischen Gründen vor allem auch physiologische (Gonenkonkurrenz) in Frage. Daß auch für HOFFMANNs abweichende Spaltungen solche Gründe verantwortlich zu

machen sind, wird dadurch wahrscheinlich gemacht, daß er zwar in den Gewächshausversuchen nur etwa 33%, nach Feldbestäubungen aber 50% Männchen fand. In eigenen Gewächshausversuchen fehlte meist $^1/_4$ der erwarteten Männchen, in v. Sengbuschs feldbestäubten Beständen fanden sich etwa 50% Männchen.

Gewisse Schlüsse über die Lokalisation der Habitus- und Geschlechtsfaktoren lassen sich aus den bisher beobachteten Sectorialchimären ableiten. Von Sengbusch fand ein Weibchen, dessen Gipfel normal männlich ausgeprägt war. Da Weibchen der Typ XXAA zukommt, ist anzunehmen, daß die Mutation durch den Verlust eines X-Chromosoms zustande kam. Dann wäre aber das Y-Chromosom als „leer" zu bezeichnen und die männlichen Geschlechts- und Habitusfaktoren in den Autosomen zu suchen. Im eigenen Material trat ein Männchen auf, dessen Gipfel weibliche Blüten ausbildete (Abb. 13; daß es sich um ein echtes Männchen handelte, wird dadurch bewiesen, daß aus von ihm bestäubten Weibchen Männchen und Weibchen hervorgingen). Die Mutation könnte durch den Verlust autosomaler männlicher Geschlechtsgene erklärt werden. Auch für die Männlichkeitsrealisatoren der feminisierten Monöcisten wurde ja bewiesen, daß sie mit den XY-Faktoren nicht gekoppelt sind.

Abb. 13. Männchen, dessen Sproßspitze weibliche Blüten trägt, aber den männlichen Habitus beibehält

Nicht jede solche „Chimäre" muß durch Mutation entstanden sein. Läßt man deutsche Monöcisten im extremen Kurztag zur Blüte kommen und läßt sie sich im Dauerlicht bei niedriger Temperatur (etwa 10°C) verjüngen, dann wächst die Sproßspitze als nahezu nacktes, fädiges Gebilde weiter (Abb. 14). Unter denselben Umständen entstand auch als nicht ganz so extreme Modifikation die Chimäre der Abb. 15, die die von v. Sengbusch abgebildete Chimäre imitiert.

Abb. 14

Abb. 15

Abb. 14 u. 15. Bei niedriger Temperatur setzt statt der normalen Verjüngung ein anomales Wachstum der Sproßspitzen ein, Blätter werden nicht gebildet, aber mehr oder weniger männliche Blüten (frühe Monöcisten)

Diskussion

Im Vorstehenden wurde eine Anzahl von geschlechtsrealisierenden Faktoren besprochen. Es sind die Geschlechtschromosomen, autosomale „Monöciegene", Gene für die photoperiodische Reaktion und an Außenfaktoren die Lichtintensität und die Photoperiode, die schon während der vegetativen Entwicklung einwirkend die Pflanze zu einer bestimmten Geschlechtsausprägung disponieren. Man kann vermuten, daß alle diese Faktoren nicht direkt in die geschlechtsdeterminierenden Prozesse eingreifen, sondern ein- und dasselbe labile System beeinflussen, das seinerseits die Wirkketten zur Ausbildung der Geschlechtsorgane hemmt oder fördert. Diese Vorstellung kann folgender Vergleich etwas deutlicher machen: Dem postulierten System vergleichbar wäre das p_H, für die beiden Wirkketten stehen zwei Fermente, die dasselbe Substrat verarbeiten, aber ein unterschiedliches p_H-Optimum haben. Jede Verschiebung des p_H hat eine Veränderung der relativen Aktivität beider

Fermente zur Folge. Selbstverständlich ist das postulierte System nicht mit dem p_H identisch.

Beim Hanfmonöcisten werden die Blütenörter entsprechend der Blattgröße durch männliche oder weibliche Blüten besetzt. Die Blätter senden kein spezifisches Geschlechtshormon zu den Meristemen, sonst müßte sich bei Pfropfungen das geschlechtsausprägende Reis nach der Unterlage richten. Viel wahrscheinlicher gelangen unspezifische Baustoffe zu den Meristemen und von dem Angebot an diesen Stoffen hängt die Geschlechtsausprägung ab. Hierfür spricht, daß der Monöcist an der Basis der Infloreszenz männliche Blüten ausbildet, also zu Beginn der Blüte, wenn das Baustoffangebot noch groß ist. Zwischen männliche und weibliche Region ist im Gewächshaus oft eine intersexe Region eingeschaltet, entsprechend der langsamen Abnahme des Baustoffniveaus. Nach dieser Vorstellung muß beim Männchen das Nährstoffniveau höher liegen als beim Weibchen. Da aber vor der Blüte Männchen und Weibchen einander vollständig gleichen, muß ein besonderer Mechanismus postuliert werden, der von Beginn der Blühinduktion ab aus gleichen Mitteln die Sproßspitze des Männchens besser versorgt als die des Weibchens. Solche Mechanismen sind bereits bekannt. Zum Beispiel ist der Stärkegehalt der Kartoffelknolle ganz unabhängig davon, ob das auf die Unterlage gepfropfte Laub genetisch stärkearm oder -reich ist (Börger u. a.). Entsprechend könnte die Sproßspitze des Hanfes sich die Baustoffe holen, die sie zur Ausbildung des ihr genetisch vorgeschriebenen Geschlechts braucht.

Folgende Beobachtungen können diese Vorstellungen stützen: Das Hanfmännchen stirbt früher, es baut sein Eiweiß sehr viel schneller ab als das Weibchen (Mothes und Engelbrecht 1952).

In einer kritischen Tageslänge, in der sie zuerst nur intersexe Blüten ausbilden, erholen sich Hanfmännchen so weit, daß sie schließlich ganz normale männliche Blüten ausbilden.

Die Ausbildung intersexer Blüten beim Männchen unterbleibt, wenn bei gleicher Tageslänge höhere Temperatur gegeben wird (Heslop-Harrison 1956).

Wie zuerst von Laibach und Kribben festgestellt wurde, kann auch äußerlich angewandter Wuchsstoff als Geschlechtsrealisator fungieren. Beim Hanfmännchen bewirkt er eine Ausbildung intersexer Blüten (Heslop-Harrison). Ob auch der pflanzeneigene Wuchsstoff bei der Geschlechtsausprägung eine Rolle spielt, ist noch fraglich. Galun (1959) testete Extrakte monöcischer und gynöcischer Kürbisse auf ihre Wuchsstoffwirkung im Hafertest. Es ergaben sich Unterschiede, doch könnten diese auch Folge der Geschlechtsausprägung sein. Jedenfalls kann der Wuchsstoff aus den besprochenen Gründen nicht mit einem Geschlechtshormon verglichen werden.

Die Versuche zur endonomen Rhythmik, die mit einer der von Blaney und Hamner angewandten Technik entsprechenden Methode

durchgeführt wurden, zeigten, daß die endonome Rhythmik auch nach mehr als zwei Cyclen nachweisbar ist. Auch NANDA und HAMNER fanden einen dritten Gipfel. Damit dürfte nun wohl der endgültige Beweis für die Richtigkeit von BÜNNINGs Theorie über die Beziehungen von endonomer Rhythmik und Photoperiodismus erbracht sein. Der Theorie scheinbar widersprechende Ergebnisse z.B. von WAREING und KRIBBEN lassen sich dadurch erklären, daß die gewählten Hauptlichtzeiten nicht genau im Abstand des ganzzahlig Vielfachen der Cyclenlänge der endonomen Rhythmik aufeinander folgten. Im Gegensatz zur Lichtblitztechnik setzt die neue Methode die Kenntnis der Dauer des endonomen Cyclus nicht voraus.

Zusammenfassung

1. Der Hanf besitzt qualitative und quantitative Kurztagsrassen.

2. Die Wirkung einzelner blühinduzierender Dunkelzeiten ist um so größer, je mehr Dauerlichttage zwischen sie eingeschaltet werden.

3. Die Cycluslänge der endonomen Rhythmik ist bei einer qualitativen Kurztagsrasse und einer quantitativen gleich. Sie beträgt etwa 21 Std.

4. Die endonome Rhythmik schwingt über längere Zeit im Dauerlicht. Fünf aufeinanderfolgende Cyclen konnten nachgewiesen werden.

5. Die Geschlechtsausprägung früher Monöcisten ist vor allem von den vor der Blühinduktion herrschenden Bedingungen abhängig. Hohe Lichtintensität und Langtag vor der Blüte fördern das männliche Geschlecht.

6. Ein Schema über die Ableitung der verschiedenen Habitus- und Geschlechtsformen aus den Männchen und Weibchen des diöcischen Hanfes durch genetische und Außenfaktoren wird aufgestellt. Schließlich wird eine Hypothese über die Geschlechtsrealisation durch genetische und Außenfaktoren entwickelt.

Herrn Professor Dr. BOGEN danke ich, daß er mir die Durchführung der Untersuchung ermöglichte.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für eine Sachbeihilfe.

Literatur

BLANEY, L. T., and K. C. HAMNER: Interrelations among effects of temperature, photoperiod, and dark period on floral initiation of soy-beans. Bot. Gaz. **119**, 10—24 (1957).

BÖRGER, H., W. HUHNKE, D. KÖHLER, F. SCHWANITZ u. R. v. SENGBUSCH: Untersuchungen über die Leistung von Kulturpflanzen. I. Das Verhalten der Komponenten des Stärkeertrags von Kartoffeln. Züchter **26**, 363—370 (1956).

BORTHWICK, H. A., and N. J. SCULLY: Photoperiodic responses of hemp. Bot. Gaz. **116**, 14—29 (1954).

BÜNNING, E.: Die entwicklungsphysiologische Bedeutung der endogenen Tagesrhythmik bei den Pflanzen. Naturwissenschaften **33**, 271—274 (1946).

CARR, D. C.: On the nature of photoperiodic induction. III. The summation of the effects of inductive photoperiodic cycles. Physiol. Plantarum (Cph.) **8**, 512—526 (1955).

CORRENS, C.: Bestimmung, Vererbung und Verteilung des Geschlechts bei den Höheren Pflanzen. In Handbuch der Vererbungswissenschaften, Bd. IIc, Berlin 1928.

EICHLER, A. W.: Blütendiagramme. Leipzig: Wilhelm Engelmann 1875.

GALUN, E.: The role of auxin in the sex expression of the cucumber. Physiol. Plantarum (Cph.) **12**, 48—61 (1959).

HESLOP-HARRISON, J.: Auxin and sexuality in *Cannabis sativa*. Physiol. Plantarum (Cph.) **9**, 588—597 (1956).

HIRATA, K.: On the sex determination in hemp. *Cannabis sativa* L. J. Soc. Agric. Forest Sapporo **19** (82), 39—54 (1927).

HOFFMANN, W.: Die Vererbung der Geschlechtsformen des Hanfes (*Cannabis sativa* L). I. Züchter **17/18**, 257—277 (1947); II. Züchter **22**, 147—158 (1952).

HUHNKE, W., C. JORDAN, H. NEUER u. R. v. SENGBUSCH: Grundlagen für die Züchtung eines monözischen Hanfes. Z. Pflanzenzücht. **29**, 55—75 (1951).

KÖHLER, D.: Die Entwicklung von *Cannabis sativa* unter dem Einfluß verschiedener Tageslängen. Physiol. Plantarum (Cph.) **11**, 249—259 (1958a).

— Zur Vererbung der Monözie beim Hanf. Z. Vererb.-Lehre **89**, 437—447 (1958b).

— Die Vererbung des Blühtermins bei *Cannabis sativa*. Z. Pflanzenzücht. **42**, 339—355 (1960).

KRIBBEN, F. J.: Zu den Theorien des Photoperiodismus. Beitr. Biol. Pflanz. **31**, 297—311 (1955).

LAIBACH, F., u. F. J. KRIBBEN: Der Einfluß von Wuchsstoff auf die Bildung männlicher und weiblicher Blüten bei einer monözischen Pflanze (*Cucumis sativus* L.). Ber. dtsch. bot. Ges. **62**, 53—55 (1949).

MCPHEE, H. C.: The genetics of sex in hemp. J. agric. Res. **31**, 935 (1925).

MOTHES, K., u. L. ENGELBRECHT: Über geschlechtsverschiedenen Stoffwechsel zweihäusiger einjähriger Pflanzen. I. Untersuchungen über den Stickstoffumsatz beim Hanf. Flora (Jena) **139**, 1—27 (1952).

NANDA, K. K., and K. C. HAMNER: The effect of temperature, auxins, antiauxins and some other chemicals on the endogenous rhythm affecting photoperiodic response of Biloxi soybean (*Glyzine max* L. Merr). Planta (Berl.) **53**, 53—68 (1959).

SCHAFFNER, H.: Influence of environment on sexual expression in hemp. Bot. Gaz. **71**, 197—219 (1921).

— The influence of relative length of daylight on the reversal of sex in hemp. Ecology **4**, 323—334 (1923).

— The change from opposite to alternate phyllotaxy and repeated rejuvenations in hemp by means of changed photoperiodicity. Ecology **7**, 315—325 (1926).

— Further experiments in repeated rejuvenations in hemp and their bearing on the general problem of sex. Amer. J. Bot. **15**, 77—85 (1928).

— The fluctuation curve of sex reversal in staminate hemp plants induced by photoperiodicity. Amer. J. Bot. **18**, 424—430 (1931).

SENGBUSCH, R. v.: Beitrag zum Geschlechtsproblem bei *Cannabis sativa*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **80**, 616—618 (1942).

— Ein weiterer Beitrag zur Vererbung des Geschlechts bei Hanf als Grundlage für die Züchtung eines monözischen Hanfes. Z. Pflanzenzücht. **31**, 319—338 (1952).

WAREING, P. F.: Experiments on the „light-break" effect in short day plants. Physiol. Plantarum (Cph.) **7**, 157—172 (1954).

Privatdozent Dr. D. KÖHLER,
Darmstadt, Botanisches Institut der T. H., Roßdörfer Str. 140

Planta 56, 174—188 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Mainz

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT DER PHENYLBORSÄURE

Von

BARBARA HACCIUS und DIETRICH MASSFELLER*

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 30. September 1960)

Wie bereits kurz mitgeteilt (HACCIUS 1959 und 1960; HACCIUS und MASSFELLER 1959), haben wir an Embryonen und Vegetationspunkten verschiedener Pflanzen-Arten beobachtet, daß Phenylborsäure (PhB) die Ausdifferenzierung von Blattprimordien während einer eng begrenzten und sicher sehr frühen Entwicklungsphase total zu hemmen vermag, während benachbarte etwas weiter fortgeschrittene Anlagen unbeeinflußt bleiben.

Wir haben diesen Effekt inzwischen näher untersucht. Im folgenden wird über Versuche mit Jungpflanzen von *Kalanchoe blossfeldiana* und *Cucumis sativus* berichtet und die Ergebnisse diskutiert.

I. Material und Methoden

1. Samen von *Kalanchoe blossfeldiana* (Sorte „Leuchtstern" und „Richard Gräser") werden im Gewächshaus zum Keimen gebracht, pikiert und die jungen Pflanzen unter Kurztagbedingungen gehalten. Nach Entfaltung des dritten bis fünften auf die Kotyledonen folgenden Blattpaares beginnen wir mit der Phenylborsäure-Applikation. Mit Hilfe einer 1 ml-Rekordspritze (Teilung 0,01 ml) werden je 0,03 ml einer 250 ppm-Lösung ($\approx 2 \cdot 10^{-3}$ m) auf die Endknospe des Hauptsprosses aufgebracht. Der Tropfen ist so bemessen, daß er von den jungen Blättchen festgehalten wird und die Sproßspitze völlig umgibt. Eine zehnmalige Applikation der Lösung in dreitägigen Abständen erwies sich bei *Kalanchoe* am wirksamsten.

2. Im Gewächshaus gekeimte Sämlinge von *Cucumis sativus*, Sorte „Vorgebirgs-Trauben", werden in 15 cm-Töpfe ausgepflanzt. Die Behandlung erfolgt nach der für *K. blossfeldiana* geschilderten Methode: Ein Tropfen (0,03 ml) der PhB-Lösung (250 ppm) wird auf die Endknospe aufgebracht. Dabei erwies sich, im Gegensatz zu *Kalanchoe*, *eine einmalige Applikation als ausreichend zur Erzielung des Effektes.* Da, wie im folgenden näher ausgeführt, die PhB-Wirkung durch den Entwicklungszustand der zu behandelnden Pflänzchen entscheidend beeinflußt wird, wählen wir für den Versuch nicht nur gleich alte, sondern auch äußerlich möglichst übereinstimmende Pflanzen aus.

3. Bei der verwendeten Phenylborsäure handelte es sich bei der Mehrzahl der Versuche um ein käufliches Präparat der Firma Heyl & Co. (Berlin-Steglitz). Außerdem hat uns Herr Dr. R. NEU (Karlsruhe) freundlicherweise eine Probe der hochgereinigten Substanz zum Vergleich zur Verfügung gestellt.

* D 77.

II. Beschreibung der nach Phenylborsäure-Anwendung beobachteten Anomalien

1. Kalanchoe blossfeldiana

Die Mehrzahl der bei *K. blossfeldiana* registrierten Blütenanomalien fanden wir in folgender Versuchsanordnung: Aussaat am 27. 2. 59; Be-

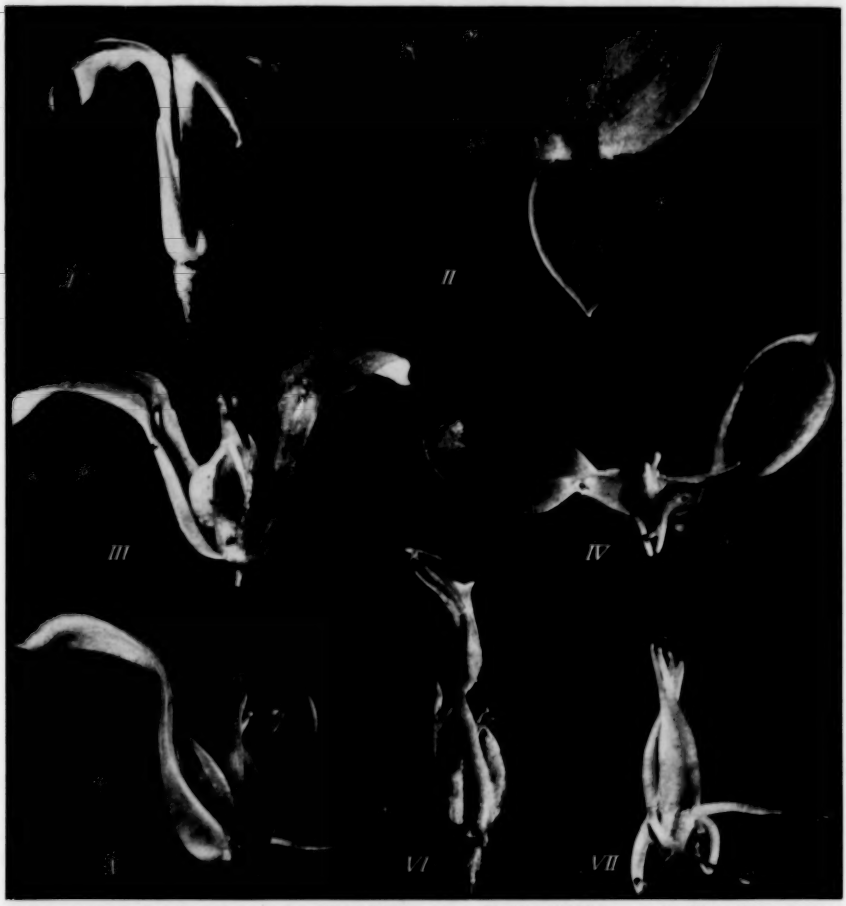


Abb. 1. Ausfallerscheinungen an den Blüten von *K. blossfeldiana* nach Phenylborsäure-Behandlung der jungen Pflanzen: *I* Choripetalie, *II* Tripetalie, *III* und *IV* Dipetalie, *V* und *VI* Monopetalie, *VII* Apetalie

ginn der Kurztagbehandlung am 20. 3. 59; Beginn der Phenylborsäurebehandlung (10mal in dreitägigen Abständen) am 13. 5. 59; Ende der PhB-Behandlung am 11. 6. 59; Entfaltung der ersten Blüten am 15. 7. 59.

In Abb. 1 *I*—*VII* sind Beispiele für die am häufigsten beobachteten Ausfallerscheinungen dargestellt. Im einfachsten Fall sind die normalerweise verwachsenen Petalen durch mehr oder weniger tiefe Einschnitte

getrennt (*I*). Daneben treten häufig drei- oder zweiteilige Blüten auf mit verwachsenen (*II*) oder getrennten (*III* und *IV*) Kronblättern. Wie Abb. 1 *V*—*VII* zeigt, kann die Reduktion bis zum vollkommenen Petalen-Ablast fortschreiten.

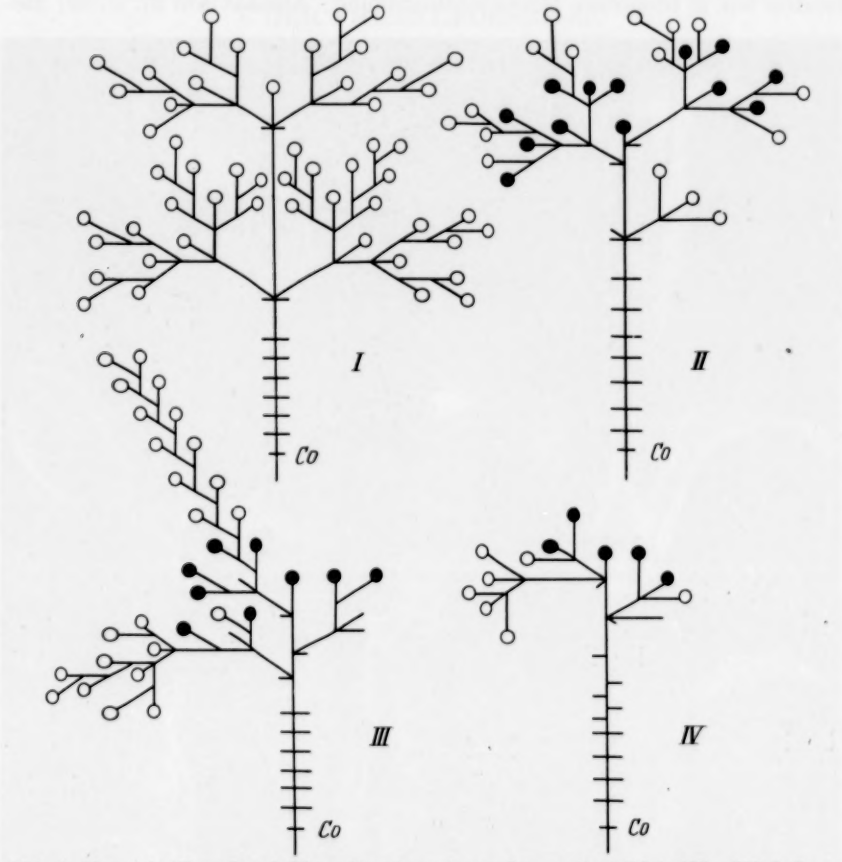


Abb. 2. Normale (*I*) und nach Phenylborsäure-Anwendung mißgebildete (*II*—*IV*) Inflorescenzen von *K. blossfeldiana*. ○ normale und ● reduzierte Blüten; *Co* Kotyledonarknoten

Häufig ist auch die Anzahl der Kelchblätter reduziert, wenn auch zumeist nicht im gleichen Maß wie die der Kronblätter. Auch im Bereich des Androeceums kommt es zu Ausfällen, während die Vierzahl der häufig eigenartig verbogenen Karpelle, soweit wir es beobachten konnten, erhalten bleibt.

Die Schemata der Abb. 2 zeigen den Inflorescenzaufbau von mit PhB behandelten Pflanzen (*II*—*IV*). Zum Vergleich ist ein normaler Blütenstand (*I*) mit den für *Kalanchoe* typischen Dichasien mit Wickelausgang danebengestellt. Bei den PhB-geschädigten *Kalanchoe*-Pflanzen

beobachtet man stets einen mehr oder weniger weitgehenden Ausfall von Teilinflorescenzen und häufig eine bereits im vegetativen Bereich beginnende Auflösung der normalerweise wirteligen Blattstellung.

Besonders interessant ist die Verteilung der reduzierten Blüten. An der in Abb. 2 *II* dargestellten Pflanze weisen die Endblüte der Hauptachse und fast alle Endblüten der Seitenachsen 1. und 2. Ordnung ein reduziertes Perianth auf, während die jüngeren Blüten alle normal ausgebildet sind. Das gleiche gilt von dem stark geschädigten Blütenstand der Abb. 2 *IV*. Auch bei dem in Abb. 2 *III* wiedergegebenen Exemplar hebt sich deutlich die Zone der anomalen älteren Blüten von den wieder normal gestalteten jüngeren Blüten ab, deren Anlegung offenbar erst nach Beendigung der PhB-Behandlung stattgefunden hat.

2. *Cucumis sativus*

a) Blütenanomalien. Wie bereits erwähnt, genügt bei der Gurke eine einmalige PhB-Applikation auf die Endknospe einer jungen Pflanze, damit *innerhalb eines Bereiches von 8—10 Sproßknoten in jeder Blattachsel eine bis mehrere abnorme Blüten gebildet werden.* Zwischen dem Behandlungstermin und dem ersten sichtbaren Auftreten von umgestalteten Blüten liegen bei günstigen Wachstumsbedingungen 3—4 Wochen.

Bei den Anomalien handelte es sich ebenso wie bei *Kalanchoe* um Blüten mit zum Teil oder ganz ablastierten Kelch- und Blütenblättern (Abb. 3 *I—VII*). Sowohl der Kelch- als auch der Kronblattkreis zeigten alle Übergänge von der normalen Fünfzahl bis zur totalen Reduktion (perianthlose Blüten). Auch das Androeceum der gehemmten Blüten war im allgemeinen deutlich sichtbar mißgestaltet, seine genauere Untersuchung steht jedoch noch aus. Bezüglich des Zeitpunktes des Auftretens von weiblichen Blüten (Abb. 3 *IV*) war kein Unterschied zwischen den behandelten Pflanzen und den Kontrollen festzustellen.

Auffallend ist die aus Abb. 3 *II—VI* ersichtliche fast (oder ganz) normale Ausbildung der den ablastierten benachbarten Petalen. Auch ist die zumeist regelmäßig äquidistale Stellung der verbliebenen Petalen bei 4- und 3zähligen Blüten bemerkenswert. Man muß daher vermuten, daß die PhB-induzierte Hemmung einzelner Petalen-Anlagen sehr früh erfolgt.

b) Anomalien im vegetativen Bereich. Neben den sehr auffälligen Blütenanomalien treten die Ausfälle im vegetativen Bereich weniger deutlich in Erscheinung, so daß wir sie zunächst übersehen hatten. Es handelt sich dabei vor allem um die Stauchung eines oberhalb des Bereichs der reduzierten Blüten gelegenen Internodiums (Abb. 4 *III*) und (oder) um den Ausfall eines oder (seltener) zweier Laubblätter unmittelbar davor oder dahinter (Abb. 4 *I*). Auf diese Weise entstehen wirtelblättrige und blattlose Stengelknoten, jene mit schopfartiger

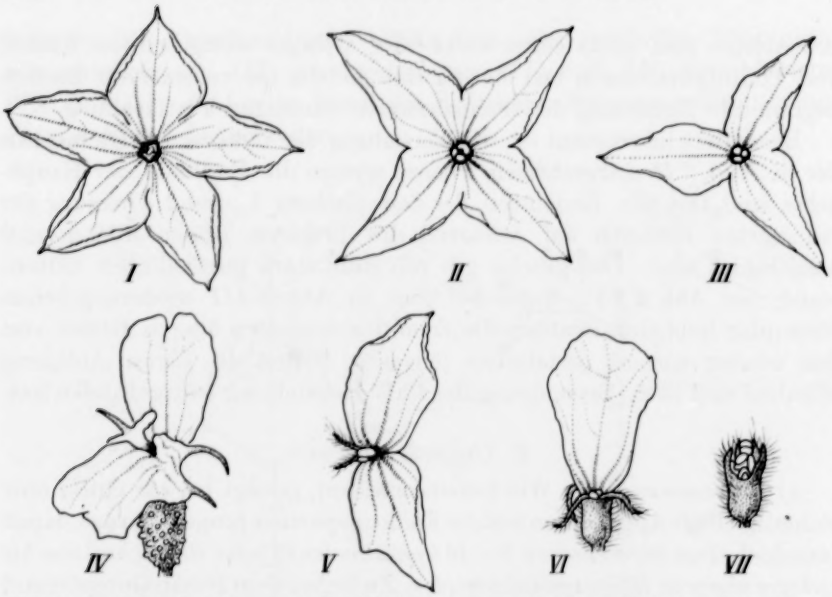


Abb. 3. Ausfallerscheinungen an den Blüten von *Cucumis sativus* nach einmaliger Phenylborsäure-Behandlung der Pflanzen: *I* Normale Blüte, *II* Tetrapetalie, *III* Tripetalie, *IV* weibliche Blüte mit 2 voll und 3 sepaloid ausgebildeten Petalen, *V* Dipetalie, *VI* Monopetalie, *VII* Apetalie

Abb. 4. *Cucumis sativus*. *I* Ausfall zweier Laubblätter 5 Wochen nach einmaliger Phenylborsäure-Applikation auf die Sproßspitze der Keimpflanze; *II* Ausfall eines Laubblattes bei Erhaltung von dessen Achselorganen; *III* Stauchung eines Internodiums oberhalb eines blattlosen Knotens (←)

Häufung der Seitenorgane (Ranken, Blüten usw.) und diese ohne jede Spur eines Blattes. Nicht selten wurden auch Sproßknoten beobachtet, deren Blätter zwar von der Phenylborsäure-Hemmung betroffen waren, nicht aber deren mit Ranken und Blüten versehenen Achselprodukte (Abb. 4 *II*).

Den „blattlosen Knoten" haben wir unsere besondere Aufmerksamkeit gewidmet, weil wir hier eine Möglichkeit sahen zur exakten anatomischen

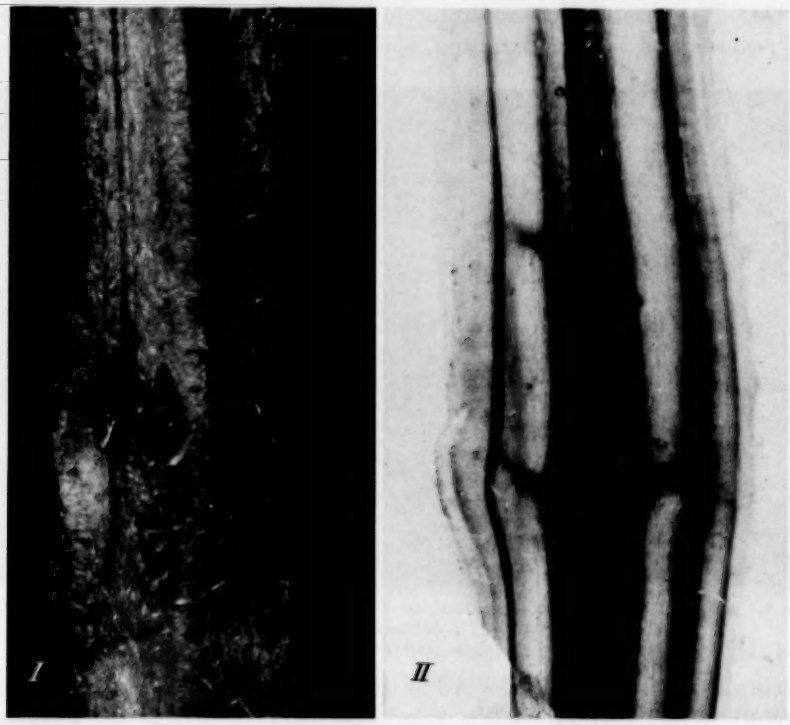


Abb. 5. Blattlose Knoten nach Phenylborsäure-Behandlung der Sproßspitzen junger *Cucumis*-Pflanzen. *I* Außenansicht; *II* Durchsichtspräparat

Feststellung des für den PhB-Effekt sensiblen Stadiums eines Primordiums. Abb. 5 *I* und *II* gibt neben einem PhB-induzierten blattlosen Knoten in Außenansicht auch dessen Durchsichtsbild wieder. Man erkennt deutlich, daß da, wo sich normalerweise das ablastierte Blatt entwickelt hätte, Commissuralnerven ausgebildet sind.

Zur Herstellung der Durchsichtpräparate haben wir ganze Sprosse nach der Methode von Camp und Liming (1932) unter Wasser abgeschnitten und in Lösungen von basischem Fuchsin (etwa 0,03%) gestellt. Nach 1—2 Tagen, sobald der Farbstoff den oberhalb des blattlosen Knotens gelegenen normalen Knoten erreicht hatte, wurden die Achsenstücke mit den blattlosen Knoten fixiert und über die Alkoholreihe in Methylbenzoat überführt. Die tiefrot gefärbten Gefäßbündel waren dann in schönster Deutlichkeit sichtbar.

Außerdem haben wir den Bündelverlauf mehrerer blattloser Knoten an Hand von Serienschnitten verfolgt. Stets waren (wenn auch nicht immer vollzählig) Commissuren zwischen den 4 inneren und den 4—5 äußeren Längssträngen vorhanden, niemals aber nach außen verlaufende Auszweigungen. Auch äußerlich war, trotz sorgfältigen Suchens, keinerlei Narbe oder sonstige Spur eines vielleicht abgefallenen Blattrudimentes feststellbar.

Der für unsere Untersuchungen wichtigste Befund war der, daß die gestauchten Internodien und blattlosen Knoten durchaus nicht an

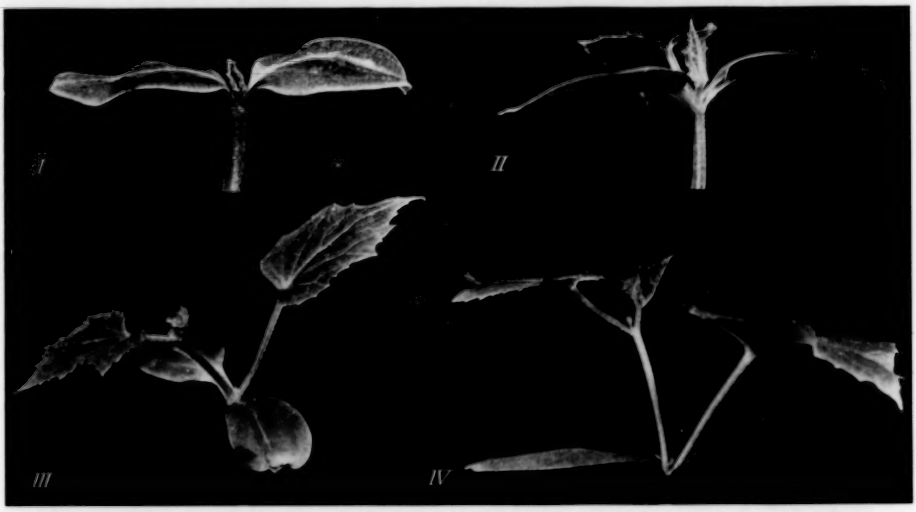


Abb. 6. *Cucumis*-Keimpflanzen auf der im Text als Behandlungsstadien 2 (*I*), 4 (*II*), 6 (*III*) und 7 (*IV*) definierten Entwicklungshöhe

beliebigen Stellen gefunden werden, sondern daß *der Ort ihres Auftretens in einer strikten Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Pflanzen am Behandlungstermin steht.*

III. Untersuchungen zur Stadienspezifität des Phenylborsäure-Effektes

Die Verteilung der Anomalien an den *Kalanchoe*- und vor allem an den *Cucumis*-Pflanzen machte, wie bereits angedeutet, eine enge Abhängigkeit des PhB-Effektes vom Entwicklungsstadium des betroffenen Organs sehr wahrscheinlich.

Wir haben daher bei unseren Versuchen mit Gurkensämlingen 8 verschiedene „Behandlungsstadien" definiert:

Stadium 1: Blatt 1 gerade sichtbar
Stadium 2: Blatt 1 in Entfaltung begriffen (Abb. 6 *I*)
Stadium 3: Blatt 1 Spreite entfaltet, Blatt 2 sichtbar
Stadium 4: Blatt 1 voll entfaltet, Blatt 2 in Entfaltung begriffen (Abb. 6 *II*)

Stadium 5: Blatt 2 Spreite entfaltet, Blatt 3 sichtbar
Stadium 6: Blatt 2 voll entfaltet, Blatt 3 in Entfaltung begriffen (Abb. 6 *III*)
Stadium 7: Blatt 3 Spreite entfaltet, Blatt 4 in Entfaltung (Abb. 6 *IV*)
Stadium 8: Blatt 3 voll entfaltet, Blatt 4 Spreite entfaltet, Blatt 5 sichtbar

Von jedem Stadium wurden pro Versuch je 10 Pflanzen in der beschriebenen Weise mit PhB-Lösung (250 ppm) behandelt.

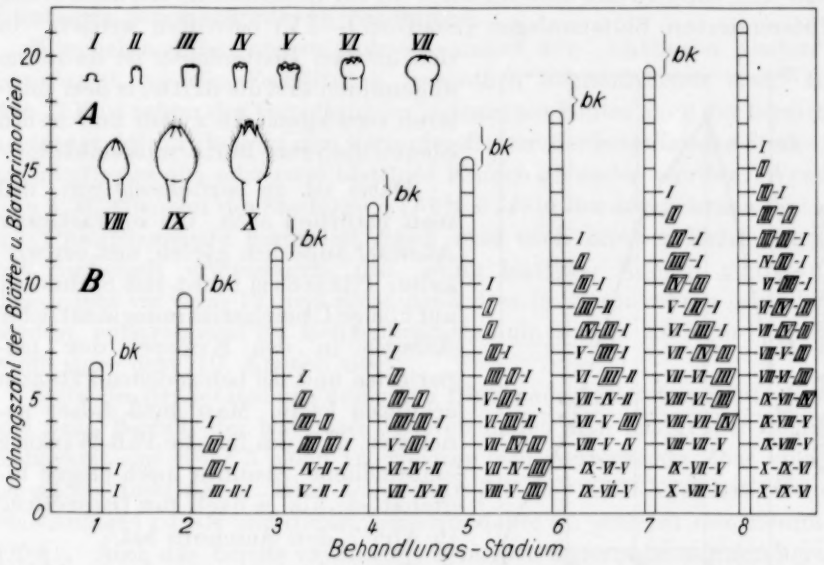


Abb. 7. Schematische Darstellung des Entwicklungszustandes der Blüten (*A I—X*) zur Zeit der Phenylborsäure-Behandlung der verschieden alten *Cucumis*-Pflanzen (*B 1—8*). □ Blüten gleicher Ordnung wiesen Anomalien auf; *bk* Bereich der blattlosen Knoten

Außerdem wurde durch Präparation und Serienschnitte nicht behandelter Pflanzen der gleichen Entwicklungsstufen festgestellt:

1. Die Gesamtzahl der sowohl zur Zeit des Behandlungstermins entfalteten als auch der am Vegetationspunkt bereits angelegten, aber äußerlich noch nicht sichtbaren Blattorgane.

2. Das jeweilige Entwicklungsstadium der in den Blattachseln bereits angelegten Blütenknospen.

Versuchspflanzen und Kontrollen wurden während eines Zeitraumes von 13 Wochen beobachtet und sämtliche Anomalien registriert. Die Ergebnisse der zweiten derartigen Versuchsreihe sind aus Abb. 7 und 8 ersichtlich.

In Abb. 7 A (*I—X*) sind die verschiedenen Stufen der Blütenknospenentwicklung und in Abb. 7 B die Präparationsergebnisse der 8 verschieden alten Behandlungs-Stadien schematisch wiedergegeben. Die Querstriche zeigen die Anzahl der angelegten oder bereits ausgebildeten Blätter an und die römischen Ziffern den Entwicklungszustand der drei

ersten Blüten in den Blattachseln[1]. Diejenigen Blüten, die nach Aussage der Versuchsprotokolle an den PhB-behandelten Pflanzen ein- oder mehrmals die geschilderten Ausfallserscheinungen aufwiesen, sind rechteckig umrahmt.

Man erkennt deutlich, daß die anomalen Blüten nicht beliebig verteilt sind, sondern daß ausschließlich die zur Behandlungszeit noch wenig differenzierten Blütenanlagen (Stadium I—IV) betroffen werden. In den unteren Blattachseln ist daher im allgemeinen erst die dritte, in den mittleren vorwiegend die zweite und in den oberen die erste Blüte mißgebildet.

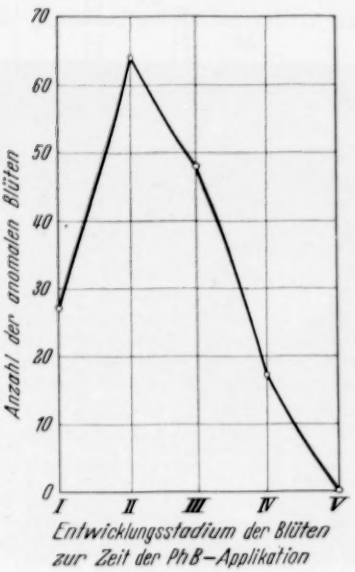


Abb. 8. Häufigkeit des Vorkommens von PhB-induzierten Anomalien bei *Cucumis*-Blüten verschiedener Entwicklungsstufen

Dabei ist zu berücksichtigen, daß man natürlich auch bei sorgfältigster Auswahl äußerlich gleich weit entwickelter Pflänzchen nicht mit Sicherheit auf völlige Übereinstimmung sämtlicher Anlagen in den Knospen der präparierten und der behandelten Pflanzen schließen kann. Man muß daher annehmen, daß das für die PhB-Wirkung empfindliche Stadium noch enger begrenzt ist, als es nach der Darstellung in Abb. 7 den Anschein hat.

Dies geht auch aus der in Abb. 8 wiedergegebenen Häufigkeitsverteilung hervor. Während nämlich aus Abb. 7 B nur ersichtlich ist, welche Blüten überhaupt mit Anomalien reagiert hatten, ist in Abb. 8 die Häufigkeit dargestellt, mit der die Blüten der Entwicklungsstufen I—V bei den insgesamt 80 (auf 8 verschiedenen Stadien behandelten) Pflanzen verändert waren. Man erkennt ein ausgeprägtes Maximum für die Stufen II und III der Blütenentwicklung, so daß in diesem Bereich etwa die für den PhB-Effekt sensiblen Stadien anzunehmen sind. Wie aus Abb. 7 A ersichtlich, werden auf dieser Stufe die Sepalen gerade angelegt, während die Petalen äußerlich noch nicht erkennbar sind.

[1] Für die gegenseitigen morphologischen Beziehungen der Blüten, Blättchen und Ranken in den Blattachseln von *Cucumis sativus* sind verschiedene und zum Teil einander widersprechende Deutungen vorgeschlagen worden, man vgl. u. a. HAGERUP (1930) und F. BUGNON (1956). Wenn wir daher im folgenden ganz allgemein von „Achselprodukten" der Primärachsenbeblätterung sprechen, so möchten wir damit keinerlei Stellung nehmen zu dem Problem, welche Blüten welchen Seitenachsen zuzuordnen seien.

Das Ergebnis der Blütenuntersuchungen bestätigt somit unsere Vermutung, daß lediglich die allerjüngsten Entwicklungsstadien einer Anlage durch PhB gehemmt werden. Allerdings ist eine genauere anatomisch-histologische Definition dieses Zustandes für die Petalen der *Cucumis*-Blüten nicht möglich, weil es größte Schwierigkeiten macht, von den in einem Knäuel beisammenstehenden Blütenanlagen präzis orientierte Serienschnitte zu bekommen.

Wir haben daher unsere Aufmerksamkeit den „blattlosen Knoten" zugewandt, wo die Verhältnisse wesentlich übersichtlicher sind. In Abb. 7 B ist neben der Verteilung der reduzierten Blüten auch der Bereich angezeigt (*bk*), in dem bei den Versuchspflanzen der betreffenden Stadien am häufigsten ein oder zwei blattlose Knoten gefunden wurden. Wenn man z. B. Pflanzen des Stadiums 4 (Abb. 6 *II*) in der angegebenen Weise mit Phenylborsäure behandelt, kann man nach unseren Erfahrungen mit Sicherheit voraussagen, daß, wenn blattlose Knoten auftreten, diese nicht vor dem 13. und nicht nach dem 15. Sproßknoten gefunden werden, entsprechend bei Behandlungsstadium 6 nicht vor dem 17. und nicht nach dem 19. Knoten usw.

Zwischen der letzten mit anomalen Blüten ausgestatteten Blattachsel und dem Bereich der blattlosen Knoten findet man mit großer Regelmäßigkeit eine über 5 bis 6 Internodien sich erstreckende Zone völlig normaler Ausbildung. Hier waren zur Zeit der PhB-Applikation die Blattanlagen zu alt und deren Achselprodukte zu jung für den Hemm-Effekt. Auch die bereits erwähnten typischen Internodienstauchungen (Abb. 4 *III*) entwickeln sich stets ober- oder unterhalb der blattlosen Knoten und niemals an anderen Stellen.

Offenbar gilt für die PhB-induzierte Hemmung einer Laubblattanlage das gleiche wie für diejenige eines Perianthblattes: Die Einwirkung muß das Primordium in einem ganz bestimmten sehr frühen Entwicklungszustand treffen, damit eine Totalhemmung erfolgen kann, etwas ältere Anlagen bleiben fast oder ganz unbeeinflußt.

Um dieses sensible Stadium nun noch genauer definieren zu können, haben wir Knospenschnitte der verschiedenen Behandlungsstadien mit der in Abb. 7 B registrierten Verteilung der blattlosen Knoten verglichen. In Abb. 9 sind Endknospen-Schnitte der Behandlungsstadien 2, 4, 6 und 8 wiedergegeben. Die Blattanlagen sind, oberhalb der Kotyledonen beginnend, durchlaufend numeriert. Bei Stadium 2 (Abb. 9 *I*) trägt z. B. die letzte im Schnitt gezeigte noch als geringfügige Vorwölbung erkennbare Blattanlage die Ordnungszahl 9. Nach PhB-Behandlung dieses Stadiums tritt jedoch die Blattlosigkeit frühestens am 9., häufiger noch am 10. oder 11. Knoten auf. Wie ein Vergleich der Abb. 9 *II—IV* mit Abb. 7 B lehrt, gilt entsprechendes auch für die übrigen Behandlungsstadien.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann man fragen, ob es sich bei dem PhB-sensiblen Stadium einer Blattanlage nicht sogar um einen *vor der äußerlichen Erkennbarkeit* liegenden Entwicklungszustand handelt. Um hier Sicherheit zu bekommen, haben wir noch folgenden Versuch durchgeführt. Von etwa 400 gleichzeitig gekeimten Sämlingen wurden sehr sorgfältig 130 möglichst übereinstimmende Exemplare eines zwischen

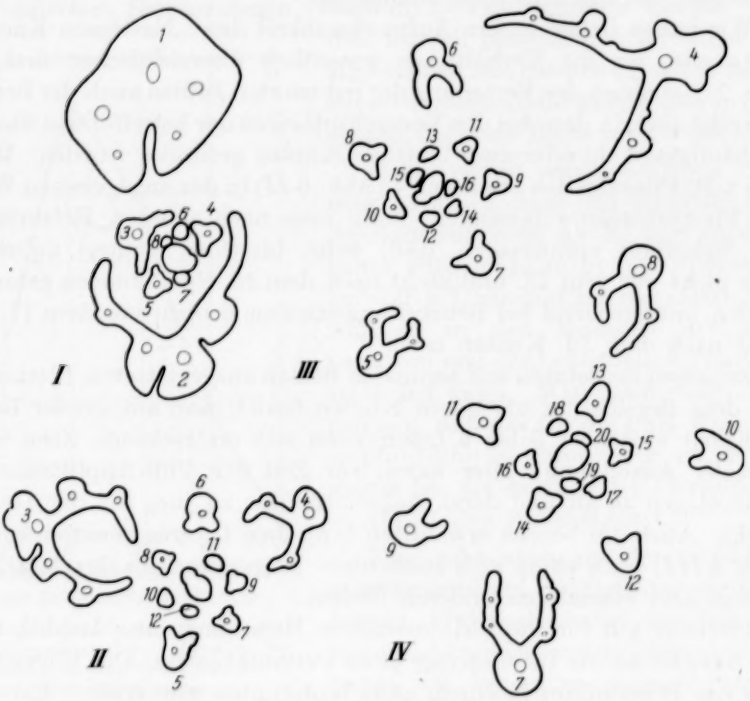


Abb. 9. Querschnitte durch die Sproßspitzen der im Text als Behandlungsstadien 2, 4, 6 und 8 definierten Keim- und Jungpflanzen von *Cucumis sativus*. Die Blattanlagen sind oberhalb der Kotyledonen beginnend numeriert

den oben definierten Stadien 1 und 2 liegenden Entwicklungsstadiums ausgewählt. Von diesen wurden 20 in FPA[1] fixiert, in Paraffin eingebettet und zu Serienschnitten verarbeitet[2]. Die übrigen 110 Pflänzchen wurden in der angegebenen Weise mit Phenylborsäure behandelt und während 6 Wochen im Gewächshaus weiterkultiviert. Dann wurden sie auf das Vorhandensein von blattlosen Knoten und auf deren Ordnungszahl hin bonitiert. Das Ergebnis ist folgender Tabelle zu entnehmen.

[1] Formalin-Propionsäure-Alkohol (5:5:90).

[2] Frl. cand. rer. nat. BARBARA HANEKE danken wir für ihre wertvolle Mitarbeit bei der Herstellung der Mikrotomschnitte.

Tabelle

Ordnungszahl des Sproßknotens	Häufigkeit, mit welcher der betreffende Knoten	
	auf den Querschnitten Ort des jüngsten Primordiums war	bei den behandelten Pflanzen Ort des blattlosen Knotens war
7	2 (10%)	0 —
8	**12 (60%)**	6 (11,5%)
9	5 (25%)	**27 (52%)**
10	1 (5%)	17 (32,5%)
11	0 —	1 (2%)
12	0 —	1 (2%)
	20	52

Von den 110 behandelten Pflanzen hatten 48 einen und 4 Exemplare 2 blattlose Knoten entwickelt. Bei den letzten wurde für die Tabelle nur der untere berücksichtigt.

Bei 52% der Fälle fehlte das Blatt am 9. und bei 32,5% am 10. Sproßknoten. Wie man jedoch auf Grund der Schnittpräparate der 20 Exemplare des Behandlungsstadiums annehmen kann, war zur Zeit der PhB-Applikation bei mehr als der Hälfte der Probanden das 9. und bei etwa einem Viertel das 10. Blatt am Vegetationspunkt noch nicht erkennbar.

Wir sehen in diesem Ergebnis eine Bestätigung unserer schon früher ausgesprochenen Vermutung (Haccius 1960), daß es sich bei den geschilderten PhB-Effekten um *eine selektive Hemmung der frühesten zur Anlegung eines Blattorganes führenden Differenzierungsprozesse handelt.*

IV. Diskussion

1. Für die Beurteilung der geschilderten selektiven Hemmung der Organdifferenzierung durch PhB ist zunächst wichtig festzustellen, ob *ähnliche Anomalien unter dem Einfluß anderer Wirkstoffe* bereits beschrieben wurden.

Es gibt zahlreiche Beobachtungen über Blütenanomalien nach der Anwendung von sogenannten Wachstumsregulatoren wie 2,4-D und verwandten Verbindungen, Naphthylessigsäuren, TIBA und anderen. Dabei handelt es sich vorwiegend um trichter- oder röhrenförmige Verwachsungen, aber auch 2,4-D-induzierte Choripetalie ist gelegentlich beschrieben worden, so für *Kalanchoe blossfeldiana* durch Kiermayer (1957). Angaben über eine regelmäßig auftretende Verminderung der Petalenzahl als Folge einer Wirkstoffapplikation gibt es jedoch unseres Wissens weder für *K. blossfeldiana* noch für *Cucumis sativus*.

Nachdem wir die Keimblatt-Ablast induzierende Wirkung der Phenylborsäure zum erstenmal an den Embryonen von *Eranthis hiemalis* erkannt hatten (Haccius 1959 und 1960), haben wir umfangreiche

Versuchsserien sowohl mit den bekannten morphoregulatorisch wirksamen Substanzen als auch mit zahlreichen der Phenylborsäure verwandten Verbindungen durchgeführt. Bisher war der typische PhB-Effekt lediglich mit Tolylborsäuren und Diborsäurebenzolen zu erzielen, während Borsäure, Phenol und die übrigen 72 getesteten Substanzen ihn eindeutig vermissen ließen. Die Versuche werden zur Zeit mit einem anderen in gleicher Weise auf PhB reagierenden, aber leichter zugänglichen Objekt wiederholt und fortgesetzt.

2. Bekanntlich handelt es sich sowohl bei *Kalanchoe blossfeldiana* als auch bei *Cucumis sativus* um Blüten mit einer sympetalen Corolla. Es ist daher recht bemerkenswert, daß man auf Grund der vorstehend geschilderten Ergebnisse annehmen muß, daß *die einzelnen Glieder des Petalenwirtels nicht gleichzeitig ausdifferenziert werden.*

Man könnte allerdings einwenden, die Verteilung der wirksamen Substanz auf dem Blütenvegetationskegel sei nicht ganz gleichmäßig gewesen, so daß aus diesem Grund nur einzelne Anlagen betroffen wurden. Dagegen spricht einmal die im Verhältnis zum angewandten Lösungsvolumen beträchtliche Kleinheit der nur in sehr frühem Entwicklungszustand (beginnende Differenzierung der Sepalen und Petalen) beeinflußbaren Blütenanlagen und zum anderen das starke zahlenmäßige Überwiegen der tetra- und trimeren *Cucumis*-Blüten gegenüber den stärker reduzierten Formen. Wenn der Ablast nur eines Teiles der Petalen die Folge einer ungleichmäßigen Verteilung des Hemmstoffes wäre, müßte das Zahlenverhältnis der Anomalien genau umgekehrt sein.

Da, wie oben eingehend geschildert, durch PhB ausschließlich Organanlagen gehemmt werden, die zum Behandlungstermin mikroskopisch noch nicht als Vorwölbung erkennbar sind, muß man annehmen, daß im Falle der so häufigen tetra- und trimeren *Cucumis*-Blüten ein Teil der Petalenprimordien den übrigen in der Entwicklung vorausgeeilt und damit für die PhB nicht mehr angreifbar war.

Während die hierin sich äußernde zeitlich getrennte Anlegung der Glieder des Petalen-Wirtels wenigstens von einigen Vertretern der Sympetalen-Familien bereits bekannt ist, sind bisher nur selten Zweifel an der „Echtheit" des Kotyledonarwirtels der Dikotylen geäußert worden. Wir konnten jedoch zeigen, daß auch bei der PhB-induzierten Unterdrückung eines oder beider Kotyledonen an Embryonen von *Eranthis hiemalis* stets die akotylen Keime gegenüber den experimentell monokotylen zahlenmäßig fast oder ganz zurücktreten (Haccius 1959 und 1960).

Neuerdings hat Straub (1959) im Zusammenhang mit entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen an di- und trikotylen Linien von *Antirrhinum majus* die Vermutung geäußert, „daß in allen Fällen zunächst nur ein einziger Cotyledo, von einer Initialzelle ausgehend, angelegt wird.

Bei dikotylen Keimlingen wird unmittelbar danach eine zweite Initiale die Anlegung des zweiten Cotyledos nach dem Prinzip des Sperreffektes so einleiten, daß es unter Einhaltung eines bestimmten Abstandes der zwei Cotyledonarprimordien zur bilateralen Symmetrie des Keimlings kommt".

Der hohe Prozentsatz an einkeimblättrigen Pflänzchen, den wir nach PhB-Behandlung undifferenzierter Embryonen erzielen konnten, kann als experimentelle Bestätigung für die Gedankengänge STRAUBs angesehen werden.

Neuerdings haben wir unser Beobachtungsmaterial an Kotyledonar- und Petalenwirteln noch um in die gleiche Richtung weisende Beobachtungen an Laubblattwirteln typisch decussierter Dikotylen-Arten erweitern können.

3. Leider reichen unsere Befunde zur Zeit noch nicht aus, um die Frage nach der *Wirkungsweise der Phenylborsäure* zu diskutieren. Wie wir in einer früheren Veröffentlichung bereits näher begründet haben (HACCIUS 1960), erscheint es uns fraglich, ob zwischen der von CAUJOLLE und BERGAL (1949a u. b, 1950a u. b) und TORSSELL (1956 und 1958) beschriebenen das Streckungswachstum von Wurzelzellen stimulierenden Wirkung der PhB und dem hier geschilderten Effekt ein engerer Zusammenhang besteht.

Summary

After 10 applications of phenylboric acid (0.03 ml of a $2 \cdot 10^{-3}$ M solution) to young plants of *Kalanchoe blossfeldiana* the flowers were found to have a reduced number of petals or no petals at all.

In *Cucumis sativus* one application of phenylboric acid at the same strength was enough to cause abnormal flowers to develop in the axils of 8 to 10 leaves; in addition there were 1 to 2 leafles nodes and other abnormalities. The position of the abnormal flowers and leafless nodes was dependant upon the stage of development of the plant at the time of application. It seems from a parallel study of treated plants grown to maturity, and plants sectioned at the time of treatment, that phenylboric acid *inhibited selectively the first differentiation processes of the leaf primordia.*

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die großzügige Unterstützung der vorliegenden Untersuchungen.

Literatur

BUGNON, F.: Valeur morphologique du complexe axillaire chez les cucurbitacées. Ann. Sci. natur., Bot., XI. s. **17**, 313 (1956).

CAMP, W. H., and F. G. LIMING: The use of basic fuchsin in plant anatomy. Stain Technol. **7**, 91 (1932).

Caujolle, F., et G. Bergal: Influence de l'acide phénylborique sur la germination de quelques Apétales. C. R. Acad. Sci. (Paris) **228**, 1249 (1949a).

— — Influence comparée des acides borique et phénylborique sur le développement des plantules de quelques Apétales. C. R. Acad. Sci. (Paris) **228**, 1516 (1949b).

— — Influence de l'acide phénylborique sur la croissance des racines isolées de *Raphanus sativus* en milieu liquide sterile. C. R. Acad. Sci. (Paris) **230**, 1101 (1950a).

— — Influence des acides borique et phénylborique sur la germination et le développement des plantules de quelques dicotylédones. C. R. Acad. Sci. (Paris) **231**, 1550 (1950b).

Haccius, B.: Morphoregulatorische Beeinflussung pflanzlicher Embryonen durch Phenylborsäure. Naturwissenschaften **46**, 153 (1959).

— Experimentell induzierte Einkeimblättrigkeit bei *Eranthis hiemalis*. II. Monokotylie durch Phenylborsäure. Planta (Berl.) **54**, 482 (1960).

—, u. D. Massfeller: Durch Phenylborsäure induzierte Reduktion der Petalen bei *Cucumis sativus*. Naturwissenschaften **46**, 585 (1959).

Hagerup, O.: Vergleichende morphologische und systematische Studien über Ranken und andere vegetative Organe der Cucurbitaceen und Passifloraceen. Dansk. bot. Ark. **6**, Nr 8 (1930).

Kiermayer, O.: Morphologische Veränderungen an Blüten von *Kalanchoe Blossfeldiana*, sowie den Brutpflanzen von *Bryophyllum tubiflorum* durch synthetische Wuchs- und Hemmstoffe. Phyton (Argentina) **9**, 53 (1957).

Straub, J.: Entwicklungsphysiologische Untersuchungen über die Zwei- und Dreizähligkeit der Wirtel von *Antirrhinum majus*. Z. Bot. **48**, 219 (1959).

Torssell, K.: Chemistry of arylboric acids. VI. Effects of arylboric acids on wheat roots and the role of boron in plants. Physiol. Plantarum (Cph.) **9**, 653 (1956).

Torssell, K., J. H. McClendon and G. F. Somers: Chemistry of arylboric acids. VIII. The relationship between physicochemical properties and activity in plants. Acta chem. scand. **12**, 1373 (1958).

Prof. Dr. B. Haccius,
Botanisches Institut der Universität Mainz

Planta 56, 189—212 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Darmstadt

ÜBER DIE ZUSAMMENSETZUNG DES NEKTARS UND DEN MECHANISMUS SEINER SEKRETION. I

Von

ULRICH LÜTTGE* **

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Oktober 1960)

I. Einleitung

Eine eingehende chemische Analyse des Nektars ist in zweierlei Hinsicht von Bedeutung. Einmal gibt sie eine Vorstellung von den Nahrungsstoffen, die den nektarsammelnden Tieren, insbesondere den Bienen, zur Verfügung stehen und damit auch von dem Material, aus dem der Honig gebildet wird. Hierbei ist nur die „natürliche" Zusammensetzung des Sekretes interessant, die vielfach durch sekundäre mikrobielle Umsetzungen der ursprünglich sezernierten Stoffe stark beeinflußt ist. Zum anderen ist die Kenntnis des Nektars eine Voraussetzung für das Verständnis des Sekretionsmechanismus. Hier ist die ursprüngliche Beschaffenheit des Nektars wichtig, also die chemische Zusammensetzung vor einer eventuell später einsetzenden spontanen oder durch mitausgeschiedene Enzyme katalysierten oder auch durch in den Nektar gelangte Mikroorganismen bewirkten Umwandlung. Eine Ergänzung und Erweiterung der bisherigen Nektaranalysen war das erste Ziel dieser Arbeit.

Über den Sekretionsmechanismus wissen wir heute zwar, daß es sich um komplizierte metabolisch gesteuerte Vorgänge handelt (FREY-WYSSLING u. AGTHE 1950; AGTHE 1951; ZIMMERMANN 1953 und 1954; FREY-WYSSLING, ZIMMERMANN u. MAURIZIO 1954; ZIEGLER 1955 u. 1956; MATILE 1956; SHUEL 1956 u. 1959; VIS 1958; BROWN 1959), zahlreiche Einzelheiten liegen aber noch völlig im Dunkeln, so daß es derzeit noch nicht möglich ist, eine präzise Vorstellung von den eigentlichen Abscheidungsvorgängen zu entwickeln. Auch zur Klärung einzelner Teilfragen dieses Problemkreises sucht die vorliegende Arbeit beizutragen; vor allem auch im Hinblick darauf, daß die Leistung der Nektarien über die Funktion der Geleitzellen im Phloem Aufschluß geben könnte, deren Tätigkeit in vielem mit der der Nektardrüsen übereinstimmt (ZIEGLER 1955, 1956; FREY-WYSSLING u. HÄUSERMANN 1960).

* Teil einer Dissertation der Fakultät für Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt.

** Herrn Professor Dr. H. ZIEGLER danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und das große Interesse, das er jederzeit ihrem Fortgang entgegenbrachte.

II. Allgemeine Methoden

1. Gewinnung des Materials. Der Nektar stark sezernierender Nektarien konnte direkt mit einer Glascapillare abgenommen und für die Analyse gesammelt werden. Bei Nektarien, die nur geringe Mengen Nektar abscheiden, erwies es sich als zweckmäßig, die nektarientragenden Organe zu isolieren und auf feuchtem Filtrierpapier in geschlossenen Petrischalen auszulegen, wobei sich die Menge des abgeschiedenen Nektars durch Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen der ausgeschiedenen konzentrierten Zuckerlösung und der wasserdampfgesättigten Atmosphäre stark vermehrt (SHUEL 1952 u. 1956, HUBER 1956). Das verdünnte Sekret (s. Abb. 1) konnte wiederum mit einer Capillare gesammelt werden. Bei *Pteridium aquilinum* KUHN scheiterte diese Methode wegen des raschen Degenerierens des abgeschnittenen Gewebes; von dieser Art konnten deshalb nur sehr geringe Nektarmengen erhalten werden.

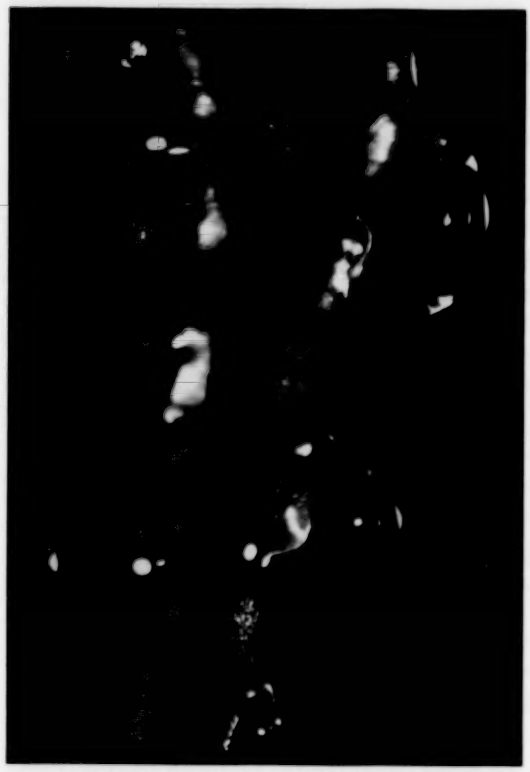


Abb. 1. Blattstiel von *Viburnum opulus* L. mit sezernierenden Nektarien. Der Blattstiel befand sich nach dem Isolieren 12 Std in einer feuchten Kammer. 11fach vergrößert

Bei den meisten der untersuchten Pflanzen gelang es ohne große Schwierigkeiten, frisch sezernierten Nektar zu ernten, der nur geringfügig mit Mikroorganismen infiziert war. Bei *Musa sapientum* L. war dies nicht möglich, da schon der Nektar eben geöffneter Blüten zahlreiche Mikroorganismen enthielt; hier wurde das „natürliche" Sekret analysiert. Die Gewinnung völlig sterilen Nektars zur Untersuchung der tatsächlichen Zusammensetzung bei der Sekretion ist experimentell schwierig. Man müßte die ganzen Pflanzen steril aufziehen, da schon innerhalb der Blütenknospen die Infektionskeime vorhanden sein können.

2. Papierchromatographie. Die Trennung von Fructose, Glucose und Saccharose wurde im allgemeinen mit Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) als Lösungsmittel absteigend durchgeführt (vgl. LINSKENS 1959). Sollte jedoch gleichzeitig die Saccharose von Oligosacchariden getrennt werden, erwies sich ein Mischungsverhältnis von 3:2:2) als zweckmäßiger. Als Sprühreagens wurde durchweg Benzidin-Trichloressigsäure verwendet, das alle Pentosen, Aldo- und Ketohexosen und Oligosaccharide entwickelt (vgl. LINSKENS 1959).

Für die aufsteigende Chromatographie der Dicarbonsäuren, der Citronensäure und der Zuckersäuren diente Essigäther-Ameisensäure-Wasser (10:2:3) als

Lösungsmittel (HEITEFUSS 1957). Die R_f-Werte, die für dieses Lösungsmittel und Whatman-I-Papier aus zahlreichen Chromatogrammen ermittelt wurden, sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Als Sprühreagens diente ein Gemisch von 2 ml Anilin und 2 g Glucose in 100 ml Butanol-Eisessig-Wasser (6:2:2). Entwickelt wurde 10 min bei 110° C (vgl. CRAMER 1958). Mit dem genannten Reagens geben alle in Tabelle 1 angegebenen Säuren braune Flecken; keine Farbreaktion zeigen auf dem Chromatogramm die freien Zucker und die Dicarbonsäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure. Da die Glucuronsäure und die Galakturonsäure mit Essigäther-Ameisensäure-Wasser nur sehr schwer zu trennen sind (vgl. Tabelle 1), wurden sie mit Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:5) als Lösungsmittel chromatographiert (vgl. LINSKENS 1959), wobei ihre R_f-Werte verhältnismäßig weit auseinanderliegen. Besprüht wurde mit Benzidin-Trichloressigsäure.

Tabelle 1. *R_f-Werte einiger Dicarbonsäuren, der Citronensäure und der Zuckersäuren in Essigäther-Ameisensäure-Wasser* (10:2:3) *und auf Whatman-I-Papier; aufsteigend*

	R_f-Werte		R_f-Werte
Fumarsäure	0,91	Citronensäure	0,57
Bernsteinsäure	0,82	Weinsäure	0,47
Malonsäure	0,78	Gluconsäure	0,31
Oxalsäure	0,68	Glucuronsäure	0,25
Äpfelsäure	0,63	Galakturonsäure	0,23

Die Ketosäuren wurden aufsteigend mit wassergesättigtem Butanol-Ameisensäure (95:5) getrennt (vgl. CRAMER 1958). Nach dem Besprühen mit Phenylendiamin (0,029 g Phenylendiamin, 5 g Trichloressigsäure, 50 ml Wasser) und zweiminütigem Entwickeln bei 100° C konnten die einzelnen Säuren auf dem noch feuchten Chromatogramm als grünlich fluorescierende Flecken mit der Analysenquarzlampe lokalisiert werden.

Die Aminosäuren wurden eindimensional absteigend in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) bzw. aufsteigend in wassergesättigtem Phenol (p_H 12) getrennt. Zur zweidimensionalen Methode wurden beide Lösungsmittel kombiniert. Besprüht wurde mit Ninhydrin und Butylalkohol. Zur Verstärkung der Farbtiefe wurde das Chromatogramm nach dem Besprühen in eine Wasserdampfatmosphäre von 100° C gebracht und dann 5 min bei 105° C entwickelt (vgl. LINSKENS 1959).

Uridindiphosphatglucose (UDPG) wurde mit Äthanol — 1 n Ammoniumacetat (7,5:3) auf dem Papier 2214a der Firma Macharey u. Nagel chromatographiert und durch seine UV-Absorption auf dem Papier mit einer Spezialanalysenlampe (Hanau) lokalisiert.

3. Colorimetrische Methoden. Die Proteinbestimmungen wurden nach der Biuretmethode durchgeführt (vgl. COLOWICK-KAPLAN 1957). $^1/_2$—1 ml Nektar wurde mit dest. Wasser auf 10 ml aufgefüllt und mit 1,5 ml 3 m Trichloressigsäure versetzt. Das ausgeflockte Eiweiß wurde abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit verworfen, der Niederschlag mit 2 ml Biuretreagens versetzt und mit Wasser auf 4 ml aufgefüllt. Nach 30 min wurde im Zeiss-Elko II mit dem Filter S 38 E 52 photometriert. Die zur Ermittlung der Absolutwerte erforderliche Eichkurve wurde mit Hilfe von hochgereinigter Urease als Protein aufgestellt.

Die größenordnungsmäßige Bestimmung der ninhydrinpositiven Substanzen im Nektar gelang nach einer von ZIEGLER (1956) angegebenen Methode zur Colorimetrierung der Ninhydrinfärbung. Die im Eppendorf-Photometer bei 578 mμ gemessenen Extinktionen wurden mit einer mit Leucin als Testsubstanz aufgestellten

Eichkurve verglichen. Dabei waren je nach der Konzentration der ninhydrinpositiven Substanzen 0,2—1,0 ml Nektar für eine Analyse nötig.

Allantoin und Allantoinsäure wurden nach einer Methode von YOUNG und CONWAY (1942) bestimmt. Nach diesem Verfahren werden Allantoin bzw. Allantoinsäure hydrolytisch gespalten, und die entstandene Glyoxylsäure wird colorimetrisch nachgewiesen. Die Messung erfolgte im Zeiss-Spektralphotometer bei 525 mμ. Die Absolutwerte wurden mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt.

Die quantitative Bestimmung der reduzierenden Zucker wurde nach der Wallenfelsschen Methode der Tetrazoliumreduktion (vgl. PAECH u. TRACEY 1955) durchgeführt. Für die Bestimmung des Gesamtzuckergehalts war vorher eine 10-min-Hydrolyse mit 1 n HCl bei 100° C im Wasserbad nötig. Für eine Zuckeranalyse genügen 0,1 ml einer 200fach verdünnten Nektarprobe.

Die Phosphatbestimmungen wurden nach der im Begleitheft zum Eppendorf-Photometer angegebenen Methode durchgeführt. Dabei wird Phosphorammoniummolybdat, das sich nach der Zugabe von Ammoniummolybdatreagens bildet, mit Metol (p-Methylamino-phenol-sulfat) zu Molybdänblau reduziert und die Reaktion mit Natriumacetat gestoppt. Photometriert wurde teils im Eppendorf-Photometer bei 578 mμ, teils im Zeiss-Elko II mit dem Filter S 38 E 52, und die ermittelten Extinktionen mit einer Eichkurve verglichen.

4. Kontaktradioautographie. Zur Herstellung von Kontaktradioautogrammen von Pflanzen und Pflanzenteilen werden dieselben in einer Presse im Vakuum-Gefriertrockner *Speedivac* (*Edwards high vacuum* ltd.) getrocknet. Durch das damit verbundene augenblickliche Gefrieren der Pflanzen werden sekundäre Verschiebungen von Stoffen während des Trocknens vermieden. Papierchromatogramme wurden direkt nach dem Trocknen autoradiographiert. Die Strahlung wurde mit Hilfe von Agfa-Röntgenfilmen aufgenommen, die wie üblich entwickelt wurden. Die Expositionszeiten werden in den einzelnen Fällen angegeben.

5. Nektarienkultur. Die Präparation der Kelchblattnektarien von *Abutilon striatum* DICKS. für Fütterungsversuche wurde in der von ZIEGLER (1956) und MATILE (1956) angegebenen Weise durchgeführt. Das Nektargewebe wurde dabei stets angeschnitten, so daß ein unmittelbarer Kontakt mit dem Kultursubstrat gewährleistet war. Das Medium (5%ige Glucose- bzw. Saccharoselösung) wurde durch Zusetzen von 1,5% Agar verfestigt, da dadurch ohne Beeinträchtigung der Ergebnisse die ganze Handhabung der Kultur wesentlich erleichtert werden kann.

6. Sonstige Methoden. Für die titrimetrische Bestimmung der Glucose wurde die von WILLSTÄTTER und SCHUDEL (1918) angegebene Methode verwendet. Dabei rufen weder Fructose nach Saccharose eine Störung hervor.

Spezielle Methoden, die zur Lösung einzelner Probleme benutzt wurden, sollen an der jeweiligen Stelle beschrieben werden.

III. Die chemische Zusammensetzung des Nektars

1. Die Zucker. Der Nektar wird als zuckerhaltiges Sekret pflanzlicher Drüsen definiert. Es sind also stets verschiedene Zucker im Nektar enthalten, und zwar im allgemeinen Saccharose, Fructose und Glucose und gelegentlich Oligosaccharide, die aus Glucose- und Fructoseeinheiten aufgebaut sind. Es kann in seltenen Fällen auch nur Saccharose im Nektar enthalten sein, wenn, wie MATILE (1956) dies für *Impatiens holstii* ENGL. et WARB. angibt, keine Invertase vorhanden ist, welche die Saccharose spaltet; zu dieser Gruppe gehören auch *Rhododendron ferrugineum* L. und *Aesculus Hippocastanum* L. (MAURIZIO 1959), ferner

bestimmte *Paeonia*-Arten (FREY-WYSSLING u. HÄUSERMANN 1960). Auch im Nektar von *Centaurea montana* L. konnte nun Saccharose als einziger Zucker nachgewiesen werden. In den anderen untersuchten Nektararten der extrafloralen Nektarien von *Platycerium* div. spec., *Photinopteris speciosa* J. SM.[1], *Sambucus ebulus* L., *Sambucus nigra* L., *Sambucus racemosa* L., *Paeonia* div. spec. (andere Formen als die von FREY-WYSSLING und HÄUSERMANN untersuchten?), *Viburnum opulus* L., *Pteridium aquilinum* KUHN, *Passiflora* spec. und *Sansevieria zeylanica* WILLD. und der Blütennektarien von *Abutilon striatum* DICKS. und *Musa sapientum* L. fanden sich nach chromatographischer Trennung stets nur Saccharose, Fructose und Glucose und keine anderen Zucker; im Nektar der extrafloralen Nektarien von *Paeonia* am Saum der Perianthblätter außerdem ein Oligosaccharid, das nach Elution vom Papier, Hydrolyse und erneutem Chromatographieren Flecken vom R_f-Wert der Glucose und der Fructose lieferte, und zwar größenordnungsmäßig — nach der Fleckenvergleichsmethode — 3—4mal soviel Fructose wie Glucose. Das Zustandekommen solcher Oligosaccharide haben FREY-WYSSLING, ZIMMERMANN und MAURIZIO (1954) und ZIMMERMANN (1954) ausführlich untersucht.

Beim Blütennektar von *Musa sapientum* L. wurden die Mengenverhältnisse der einzelnen Zucker zueinander genauer untersucht. Durch Chromatographieren und durch visuellen Vergleich mit Flecken gleichzeitig chromatographierter bekannter Zuckermengen ergaben sich für eine Probe des Nektars folgende Werte: 120—160 mg Saccharose, 80 mg Glucose und 80 mg Fructose pro ml Nektar, also ein Verhältnis von Glucose zu Fructose wie 1:1. Mit einer anderen Nektarprobe wurde dies mit einer Methode nachgeprüft, die kurz geschildert sein soll. Die Glucose wurde vor und nach Hydrolyse einer Probe nach der Methode von WILLSTÄTTER und SCHUDEL (1918) titrimetrisch bestimmt und so die Menge der freien Glucose und der Gesamtglucose erhalten. Durch Differenzbildung konnte die in der Saccharose gebundene Glucose und damit die Saccharosemenge errechnet werden. Der Gesamtzucker wurde nach Hydrolyse colorimetrisch mit Hilfe der TTC-Reaktion bestimmt. Durch Abziehen der für die freie Glucose und die Saccharose gewonnenen Werte konnte die Menge der freien Fructose ermittelt werden. Das Ergebnis war folgendes: 95,0 mg Saccharose, 33,6 mg Glucose und 33,3 mg Fructose pro ml Nektar, also ebenfalls ein Verhältnis Glucose:Fructose $\cong$ 1:1.

Gesamtzuckeranalysen von 12 verschiedenen Proben von *Musa*-Nektar ergaben einen Mittelwert von 331, bei Extremwerten von 162 und 450 mg Gesamtzucker pro ml Nektar.

[1] Die Drüsen von *Photinopteris speciosa* J. SM. konnten als Nektarien identifiziert werden.

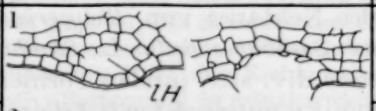
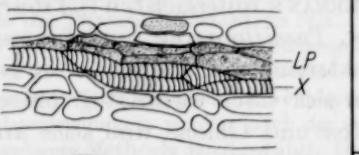
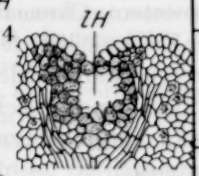
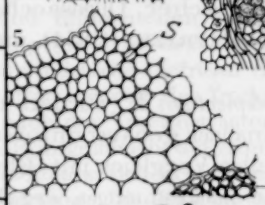
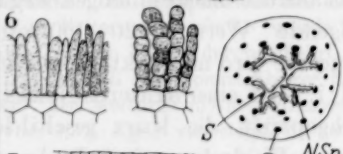
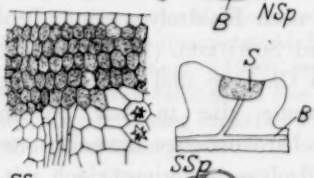
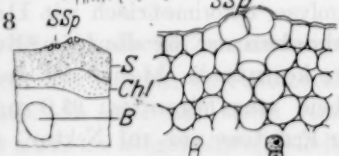
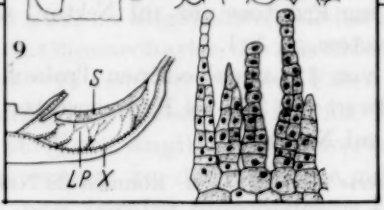
	Name	Nektarium	γ ninhydrinpositive Substanzen je g Zucker	ninhydrinpositive Substanzen in % bezogen auf den Zuckergehalt
1	*Platycerium div. spec.*		19610	1,96
2	*Paeonia spec.*		5880	0,59
3	*Sambucus nigra L.*		4760	0,48
4	*Sambucus racemosa L.*		3790	0,38
5	*Sansevieria spec.*		540	0,05
6	*Musa sapientum L.*		430	0,04
7	*Viburnum opulus L.*		430	0,04
8	*Pteridium aquilinum Kuhn*		130	0,01
9	*Abutilon striatum Dicks.* *Robinia pseudo-acacia L.* *Hoya carnosa R. Br.*		5	0,0005

Abb. 2. (Legende nebenstehend)

2. *Die Stickstoffverbindungen.* Im Verhältnis zum Siebröhrensaft, der die Kohlenhydratquelle der Nektarien darstellt (FREY-WYSSLING und AGTHE 1950), ist der Gehalt an ninhydrinpositiven Substanzen im Nektar gering, ein Beweis für die Filtration, die vom Nektargewebe vorgenommen wird. So enthält der Siebröhrensaft von *Robinia pseudoacacia* L. die 5000fache Menge ninhydrinpositiver Substanzen wie der Nektar derselben Pflanze (ZIEGLER 1956). Bei anatomisch primitiveren Nektarien ist diese Filterung in bezug auf die ninhydrinpositiven Substanzen mehr oder weniger stark herabgesetzt, Abb. 2 gibt für verschiedene Nektarientypen die Menge der ninhydrinpositiven Substanzen je Gramm Zucker im Nektar an.

Den höchsten Wert weist der Nektar der *Platycerium*-Arten auf, der an der Oberfläche der jungen Mantelblätter ausgeschieden wird, ohne daß ein besonders ausgebildetes Nektarium zu beobachten wäre. Der Nektar wird hier in den subepidermalen Zellagen gebildet und gelangt durch Auseinanderreißen der Epidermis nach außen (DÜMMER 1911). Bei *Paeonia* handelt es sich ebenfalls um sog. „gestaltlose" Nektarien am Saum der Perianthblätter, wobei hier die Leitparenchymzellen der Nervenendigungen direkt an die Atemhöhlen der Spaltöffnungen anschließen, durch welche die Sekretion erfolgt (ZIMMERMANN, J. G. 1932, FREY-WYSSLING u. HÄUSERMANN 1960). Bei den extrafloralen Nektarien der verschiedenen *Sambucus*-Arten erfolgt eine Gewebsauflösung im Inneren der Nektarien (J. G. ZIMMERMANN 1932). Der Verfasser konnte diese Gewebsauflösung durch Untersuchung der verschiedenen Stadien von einer Lockerung des Zellgefüges bis zur Ausbildung eines Hohlraumes verfolgen. Bei *Sansevieria* bilden die Brakteen der Blütenstände gestaltlose Nektarien (vgl. auch FREY-WYSSLING u. HÄUSERMANN 1960). Die Sekretionsorgane von *Musa*, die schon ein hochentwickeltes Drüsengewebe besitzen, gehören zu den sog. Septalnektarien (SCHNIEWIND-THIES 1897). Die Blattnektarien von *Viburnum opulus* L. weisen ebenso wie die Nektarien von *Pteridium aquilinum* KUHN (BONNIER 1878, DARWIN 1877, FIGDOR 1891, LLOYD 1901, FREY-WYSSLING 1935, FREY-WYSSLING u. HÄUSERMANN 1960) ein wohlausgebildetes Nektargewebe auf. Bei *Pteridium* erfolgt die Ausscheidung durch Spaltöffnungen. In den tieferen Zellagen findet sich ein gut gekennzeichnetes und begrenztes Chlorenchym, über dessen Bedeutung für die Sekretion jedoch nichts Näheres gesagt werden kann.

Abb. 2. Ninhydrinpositive Substanzen im Nektar verschiedener Pflanzen im Vergleich zur Anatomie der betreffenden Nektarien. Skizze 1 nach DÜMMER (1911); Skizze 2 nach ZIMMERMANN (1932); Skizze 9 nach AGTHE (1951); die Skizzen 3—8 sind Originale. Menge der ninhydrinpositiven Substanzen im Nektar von *Abutilon*, *Robinia* und *Hoya* nach ZIEGLER (1956). *B* Leitbündel. *BSch* Bastscheide eines Leitbündels, *Chl* Chlorenchym, *lH* lysigener Hohlraum, *LP* Leitparenchym, *NSp* Nektarspalt, *S* Sekretionsgewebe, *SSp* Saftspalte, *X* Xylem

Den geringsten Stickstoffgehalt hat der Nektar der höher entwickelten Blütennektarien von *Hoya carnosa* R. BR., *Robinia pseudoacacia* L. und *Abutilon striatum* DICKS. Zwischen diesen und den primitiv gebauten Drüsen können — wie Tabelle 2 zeigt — alle Übergänge gefunden werden.

Der Nachweis der einzelnen Aminosäuren, die im wesentlichen die Fraktion der ninhydrinpositiven Substanzen bilden, ist wegen ihrer geringen Menge schwierig. Im Nektar von *Sansevieria zeylanica* WILLD., der, wie aus Tabelle 2 hervorgeht, eine verhältnismäßig große Menge ninhydrinpositiver Substanzen enthält, konnten chromatographisch Alanin, weniger Threonin und noch weniger Glutaminsäure nachgewiesen werden.

Tabelle 2. *Aminosäuren im Nektar von Musa sapientum* L.

Die gleiche Anzahl von Kreuzen bedeutet größenordnungsmäßig — nach der Fleckenvergleichsmethode — übereinstimmende Konzentrationen.

Glutaminsäure .	++++	Tyrosin .	+
Aparaginsäure .	+++	Cystin . .	+
Methionin . .	+++	Prolin . .	+
Serin	++	Alanin . .	+

Die sauren und einige neutrale Aminosäuren ließen sich in der Fraktion der organischen Säuren nachweisen.

Die Ergebnisse verschiedener Chromatogramme des *Musa*-Nektars sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Da bei verschiedenen Ahornarten im Siebröhrensaft die Ureide Allantoin und Allantoinsäure als Stickstofftransportsubstanzen gefunden wurden (ZIEGLER u. SCHNABEL 1960), lag es nahe, nach diesen Stoffen auch im Nektar zu suchen. Der Nektar von *Acer platanoides* L., der durch Auslegen von Blüten auf feuchtem Filtrierpapier gewonnen werden konnte, enthielt tatsächlich 60 γ Allantoin und 50 γ Allantoinsäure je Gramm Zucker. Auch hier zeigt sich eine Filterung durch die Nektarien, wenn man diesen Werten die von ZIEGLER u. SCHNABEL ermittelten Konzentrationen im Siebröhrensaft gegenüberstellt, die zwischen 1610 und 4020 γ Gesamtallantoin je Gramm Zucker — je nach der Höhe der Entnahme des Siebröhrensaftes am Stamm — lagen, also das 14,8- bis 36,5fache der im Nektar gefundenen Konzentrationen betrugen.

Ein derartiger Vergleich zwischen Nektar und Siebröhrensaft kann aber nur mit Einschränkung vorgenommen werden, da nämlich zur Blütezeit im Frühjahr bzw. im Frühsommer noch kein Siebröhrensaft zur Verfügung steht, dieser vielmehr erst im Sommer bzw. Herbst gewonnen werden kann. Im vorliegenden Falle wurden die zum Vergleich herangezogenen Werte mit Siebröhrensaft ermittelt, der im vorhergehenden Herbst gezapft worden war.

Neben den Aminosäuren und — beim Ahorn — den Ureiden, die zweifelsohne durch die Nektardrüsen abgeschiedene Stickstoffverbindungen darstellen, findet man gelegentlich auch größere Mengen Protein, die wohl sekundär in den Nektar hineingekommen sind (BUXBAUM

1927). Dieser Proteingehalt ist durch die in den Nektar gelangten Pollen und die Infektion mit Mikroorganismen zu erklären (vgl. EWERT 1932). Nach ORR (1924/25) sollten in einem Falle die Bakterien im Nektar sogar den Luftstickstoff assimilieren können.

Als besonders stark mit Mikroorganismen infiziert erwies sich — wie erwähnt — der Nektar der für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung stehenden Bananenpflanze, der schon bei ganz jungen, eben aufgebrochenen Blüten eine deutliche Trübung zeigte. In je 1 ml Nektar älterer Blüten wurden im Durchschnitt 5,85 mg Protein, in je 1 ml Nektar eben geöffneter Blüten 2,75 mg Protein gefunden. Nach Filtration durch ein Bakterienfilter war in dem Nektar mit der Biuretmethode kein Eiweiß mehr nachweisbar. Durch diese Infektion des Nektars erhöht sich sein Eiweißgehalt also beträchtlich, was auch für die Stickstoffernährung der blütenbesuchenden Wirbeltiere, namentlich der Kolibris und der Fledermäuse (*Musa* ist eine Fledermausblume) von Bedeutung sein kann.

DOLD (1947) hat im Naturhonig antibakterielle Hemmstoffe nachweisen können. Inwieweit solche Hemmstoffe schon im Nektar enthalten sind, oder — was wahrscheinlicher ist — erst durch die Bienen in den Honig hineingebracht werden, müßte geprüft werden.

3. Die organischen Säuren. Außer den Aminosäuren sind noch andere kurzkettige organische Säuren im Nektar enthalten, die sich aber wegen ihrer geringen Konzentration bisher zumeist dem Nachweis entzogen haben, den schon BEUTLER 1930 versucht hat. Ascorbinsäure wurde von WEBER (1942, 1951) im Nektar von *Fritillaria imperialis* L. und von *Impatiens holstii* ENGL. et WARB. und von BUKATSCH u. WILDNER (1956) im Nektar von zahlreichen weiteren Arten nachgewiesen.

Die Schwierigkeit beim chromatographischen Nachweis der organischen Säuren ergibt sich daraus, daß die starke Zuckerkonzentration des Nektars es nicht erlaubt, genügende Mengen auf den Startpunkt aufzutragen. Die Entfernung der Hauptmenge der Zucker gelang mit Hilfe von Ionenaustauschern. Zu diesem Zweck wurden die Säuren des Nektars an eine kleine Säule von stark basischem Austauscher III der Firma Merck (etwa 10 g; Durchmesser der Säule 2,7 cm; Länge 3 cm) adsorbiert. Die zur Untersuchung vorgesehene Nektarprobe wurde vorher mit etwa 1 Liter dest. Wasser verdünnt. Anschließend wurde die Säule gut mit dest. Wasser gewaschen, worauf die Säuren mit etwa 600 ml 1 n-Ammoniumcarbonat eluiert wurden. Das Eluat wurde an einer Säule von stark saurem Austauscher I der Firma Merck (100 g; Durchmesser 4,5 cm; Länge 9 cm) seiner Ammoniumionen entledigt, wobei der Austauscher nach je 200 ml regeneriert werden mußte. (Regenerieren des sauren Austauschers mit 600 ml 4,5%iger HCl, des basischen Austauschers mit 150 ml 10%iger NaOH, anschließend waschen mit dest. Wasser, bis der Durchlauf keine saure bzw. alkalische Reaktion mehr zeigt). Durch Einengen des Durchlaufs durch die zweite Säule im Vakuum bei 30—40° C wurde eine Fraktion gewonnen, die neben den Dicarbonsäuren, Ketosäuren und Zuckersäuren die sauren und einige neutrale Aminosäuren und nur noch Spuren freier Zucker enthielt und je nach der Menge des verwendeten Nektars einen

p_H-Wert zwischen 1 und 3 aufwies. *Von Abutilon striatum* Dicks. wurden 8 ml, von *Musa sapientum* L. 35 ml Nektar zur Untersuchung herangezogen.

Tabelle 3 gibt die Ergebnisse nach der chromatographischen Trennung der Dicarbonsäuren und der Zuckersäuren wieder. Dabei zeigte sich, daß sowohl im Nektar von *Musa*, als auch im Nektar von *Abutilon* lediglich Galakturonsäure und keine Glucuronsäure enthalten ist.

Tabelle 3. *Organische Säuren im Nektar von Abutilon striatum* Dicks *und Musa sapientum* L.

Die gleiche Anzahl von Kreuzen bedeutet größenordnungsmäßig — nach der Fleckenvergleichsmethode — übereinstimmende Konzentrationsverhältnisse. Laufmittel: Essigäther-Ameisensäure-Wasser bzw. Butanol-Äthanol-Wasser.

	Abutilon	Musa		Abutilon	Musa
Fumarsäure . .	+++	+	Citronensäure .	++++	++++
Bernsteinsäure .	+	++	Weinsäure . . .	++++	+++++
Äpfelsäure . . .	+++	++	Gluconsäure . .	++	++
Oxalsäure . . .	++	+++	Galaktonsäure .	++	++

An Ketosäuren konnte bei *Musa* und bei *Abutilon* nur α-Ketoglutarsäure nachgewiesen werden. Im Nektar von *Viburnum opulus* L. fand sich nur Citronensäure, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß sich andere, im Nektar weniger konzentriert vorliegende Säuren dem Nachweis entzogen haben, da hier nur eine geringe Menge Nektar für die Analyse zur Verfügung stand.

Auf eine quantitative Bestimmung der einzelnen Säuren mußte zunächst verzichtet werden, da der Austauschvorgang und der Vorgang des Einengens (Flüchtigkeit einzelner Säuren) quantitativ nicht zu übersehen sind. Auch aus der Titration des Nektars,- bzw. aus seinem p_H-Wert kann auf die Gesamtmenge der organischen Säuren (Dicarbonsäuren, Ketosäuren, Aminosäuren, Zuckersäuren) kein Rückschluß gezogen werden, da die Säuren wegen des Kationengehalts des Nektars auch zum Teil als Salze vorliegen können, andererseits der Nektar ein stark gepuffertes System darstellt, was leicht durch Vergleich von Titrationswerten mit p_H-Messungen zu zeigen ist. Die Titration von *Musa*nektar mit m/10 und m/100 KOH bzw. die Rücktitration von vorgelegter m/10 KOH mit m/10 HCl gegen Phenolphtalein als Indicator mit einer Mikrobürette ergab einen Verbrauch von 0,06 ml m/10 KOH je Milliliter Nektar, was einer Wasserstoffionenkonzentration von $6 \cdot 10^{-3}$ entspräche. Der daraus zu berechnende p_H-Wert würde — log 0,006 = 2,2 betragen, während der tatsächliche p_H-Wert (Universalindicator flüssig der Firma Merck) bei 4,5 lag, entsprechend einer Wasserstoffionenkonzentration von $3 \cdot 10^{-5}$.

Die Frage nach der Herkunft der Säuren im Nektar ist nicht ohne weiteres zu entscheiden. Die von Beutler (1930) und von Ewert (1932) erwogene Möglichkeit, daß es sich hierbei um Stoffwechselprodukte der im Nektar enthaltenen Mikroorganismen handeln könnte, kann vor allem bei dem stark infizierten Nektar von *Musa sapientum* L., der für die obigen Untersuchungen herangezogen wurde, zutreffen. Die

Tatsache, daß SCHNABEL einige dieser Säuren auch im Siebröhrensaft verschiedener Bäume finden konnte (unveröffentlicht), läßt jedoch angesichts der Ähnlichkeit der Drüsenfunktion der Geleitzellen und der Nektarien auch an die Möglichkeit einer Ausscheidung der Säuren durch das Sekretionsgewebe denken.

4. Die Phosphatfraktion. Da Phosphorylierungsmechanismen bei der Nektarsekretion mit Sicherheit eine sehr wesentliche Rolle spielen (ZIEGLER 1955, 1956; MATILE 1956; VIS 1958; FREY-WYSSLING u. HÄUSERMANN 1960), ist auch der Phosphatgehalt des Nektars selbst von Interesse.

Die älteste Gesamtphosphatasebestimmung führte v. PLANTA (1886) mit eingedicktem Nektar von *Protea mellifera* THUNB. durch. Eine Aufgliederung des

Tabelle 4. *Phosphatverbindungen im Nektar von Musa sapientum* L.

	Auf 1 ml Nektar bezogen		Auf 1 g Zucker bezogen	
	γ/ml	‰	γ/ml	‰
Anorganisches Phosphat	186	0,19	732	0,73
Leichthydrolysierbares Phosphat .	79	0,08	311	0,31
Schwerhydrolysierbares Phosphat .	54	0,05	213	0,21
Gesamtphosphat	319	0,32	1256	1,25

Phosphatgehaltes in die verschiedenen Fraktionen, nämlich anorganisches Phosphat, leicht hydrolysierbare organische Phosphatverbindungen (= „7 min-Phosphat") und schwer hydrolysierbare organische Phosphatverbindungen ist von ZIEGLER (1956) für den Nektar von *Robinia pseudo-acacia* L. vorgenommen worden.

Für den Nektar von *Musa sapientum* L. konnten durch eine größere Anzahl von Analysen genauere Mittelwerte gewonnen werden, die in Tabelle 4 wiedergegeben sind.

5. Die durchschnittliche Zusammensetzung des Nektars von Musa sapientum L. Der Nektar von *Musa sapientum* L. wurde am eingehendsten analysiert, da hiervon die größte Menge zur Verfügung stand. Der Nektar von Bienenblüten konnte aus Mangel an Material nicht so genau untersucht werden. Obwohl die Banane von Fledermäusen bestäubt wird, zeigte sich in einem Versuch, daß ihr Nektar von Bienen ohne weiteres angenommen wird, also keine Stoffe enthält, die auf die Bienen abstoßend wirken. Die gemittelten Ergebnisse der verschiedenen Analysen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Die ermittelte Gesamtmenge der ninhydrinpositiven Substanzen wurde auf die verschiedenen papierchromatographisch gefundenen Aminosäuren nach den auf den Chromatogrammen geschätzten Mengenverhältnissen aufgeteilt, die Aminosäuremengen sind also nur als Näherungswerte zu betrachten.

Tabelle 5. *Durchschnittliche Zusammensetzung des Nektars von Musa sapientum* L., *soweit er in der vorliegenden Arbeit analysiert wurde*

Die angegebenen Werte beziehen sich auf 1 ml Nektar.

Zucker		320 mg	
Glucose	80 mg		
Fructose	80 mg		
Saccharose	160 mg		
Ninhydrinpositive Substanzen		140 γ	
Glutaminsäure	35 γ		
Asparaginsäure	26 γ		
Methionin	26 γ		
Serin	17 γ		
Tyrosin	9 γ		
Cystin	9 γ		
Prolin	9 γ		
Alanin	9 γ		
Protein		2,75 mg bis 5,85 mg	
Organische Säuren			
Fumarsäure			
Bernsteinsäure			
Äpfelsäure			
Oxalsäure			
Citronensäure			
Weinsäure			
α-Ketoglutarsäure			
Gluconsäure			
Galakturonsäure			
Phosphat			319 γ
Anorganisches Phosphat			186 γ
Leichthydrolysierbares Phosphat			79 γ
Schwerhydrolysierbares Phosphat			54 γ

6. Der Tyrosinasegehalt des Nektars von Lathraea. Über den Enzymgehalt des Nektars weiß man verhältnismäßig wenig. Bekannt ist sein Gehalt an Invertase. DAUMANN (1931) berichtet von der eiweißverdauenden Fähigkeit des Nektars von *Nepenthes*. Besonders eigenartig ist das Vorkommen einer Tyrosinase im Nektar von *Lathraea*. Nektarien von *Lathraea squamaria* L. wurden auf einen Glucoseagar in geschlossenen Petrischalen gesetzt. Nach einigen Stunden färbten sie sich ganz schwarz, hatten aber in dieser Zeit eine reichliche Menge Nektar abgeschieden, der ebenfalls dunkel gefärbt war. Die Nektarien von *Lathraea clandestina* L. verhielten sich ebenso. Die Vermutung, daß es sich hierbei um Melanine handelt, war sehr naheliegend; die ganzen *Lathraea*-Pflanzen werden schwarz, wenn man sie abschneidet. Da im Pflanzenreich noch andere stickstofffreie, schwarze Pigmente, wie die Phytomelane der Compositen und andere Oxydationsprodukte stickstofffreier Phenole, bekannt sind, galt es zunächst nachzuweisen, daß es sich bei dem dunklen Farbstoff der *Lathraea*-Pflanzen um echte Melanine im Sinne der Paechschen Definition handelt (PAECH 1950). Zu diesem Zweck wurde ein wäßriger Extrakt aus *Lathraea clandestina* L. durch Homogenisieren von Pflanzenteilen mit Wasser und Abzentrifugieren hergestellt. Zu diesem Auszug wurde C^{14}-Tyrosin gegeben und nach einiger Zeit das entstandene Pigment mit Trichloressigsäure ausgefällt, der Niederschlag abzentrifugiert und sorgfältig mit Trichloressigsäure gewaschen. Dann wurde das Pigment mit dem Geigerzähler getestet. Es zeigte sich dabei, daß das radioaktiv markierte Tyrosin in den Farbstoff eingebaut wurde. Es handelt sich also um die Bildung

eines echten Melanins; in dem wäßrigen Auszug aus dem *Lathraea*-Gewebe war ein Enzym enthalten, das mit Tyrosin als Substrat ein schwarzes Pigment aufzubauen vermochte: Eine Tyrosinase.

Auf diese Beobachtungen hin wurde farbloser, frischer Nektar von *Lathraea clandestina* L. optisch auf Tyrosinaseaktivität getestet. Der Nektar wurde mit einer Kunststoffcapillare vorsichtig gesammelt, um jedes Verletzen von Blütengewebe zu vermeiden. Zum Test wurde eine Quarzküvette (1 cm Schichtdicke) mit 0,1 ml DOPA (Dioxyphenylalanin) als Substrat für die Enzymreaktion und 0,5 ml Nektar mit Phosphatpuffer vom p_H 6,8 auf 2 ml aufgefüllt und der Reaktionsverlauf im Zeiss-Spektralphotometer bei 450 mμ gemessen. Als Kontrolle diente eine Küvette, die zusätzlich 0,1 ml gesättigter wäßriger Lösung von Phenylthioharnstoff enthielt; Phenylthioharnstoff ist ein Inhibitor der Tyrosinase. In der ersten Küvette konnte ein deutliches Ansteigen der Extinktion beobachtet werden (Abb. 3).

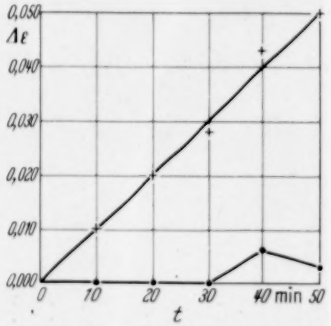


Abb. 3. Optischer Test der Tyrosinase im Nektar von *Lathraea clandestina* L. . Extinktionsänderungen (ΔE) mit (●) und ohne (+) Zusatz von Phenylthioharnstoff

Das für die Melaninbildung erforderliche Enzym ist also im Nektar der intakten Pflanzen enthalten; es fehlt hier offenbar nur am Substrat. Um das zu prüfen, wurde *Lathraea*-Nektar mit Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1) als Laufmittel chromatographiert. Besprüht wurde das Chromatogramm zunächst mit einer 1%igen Lösung von diazotierter Sulfanilsäure und dann, ohne vorher getrocknet zu werden, mit einer 10%igen Natriumcarbonatlösung. Mit diesen Agentien reagieren nur Histidin, Histamin und Tyrosin, und zwar ergeben die beiden erstgenannten grellrote und das letztere goldbraune Flecken (vgl. Beloserski u. Proskurjakow 1956). Es konnte auf diese Weise kein Tyrosin im *Lathraea*-Nektar nachgewiesen werden. Da die untere Nachweisgrenze der Methode bei 5 γ liegt und wegen der hohen Zuckerkonzentration des Nektars nur $^1/_{50}$ ml auf das Chromatogramm aufgetragen werden konnten, kann nur ausgesagt werden, daß nicht mehr als 250 γ Tyrosin in 1 ml Nektar enthalten waren.

Die eigentliche Ausgangsverbindung für die Melaninbehandlung ist das DOPA, das auch bei dem oben beschriebenen optischen Test als Substrat verwendet wurde und das durch Oxydation aus dem Tyrosin entstehen kann. Auch sein Fehlen im Nektar müßte gezeigt werden, um sicher zu gehen, daß in ihm kein Substrat für die Melaninbildung enthalten ist, und daß nicht etwa der Ablauf der Enzymreaktionen auf

andere Weise — z. B. durch Inhibitoren — unterbunden ist. Die Tatsache, daß man beim optischen Test mit reinem Nektar unter Zusatz von Substrat eine Reaktion bekommt, ist jedoch eine starke Stütze für die erste Annahme.

IV. Der Mechanismus der Nektarsekretion

1. Die Rückresorption von Stoffen durch die Nektarien. Die Arbeiten von FREY-WYSSLING und AGTHE (1950), AGTHE (1951) und ZIMMERMANN (1953) haben gezeigt, daß es sich beim Nektar um ausgeschiedenen

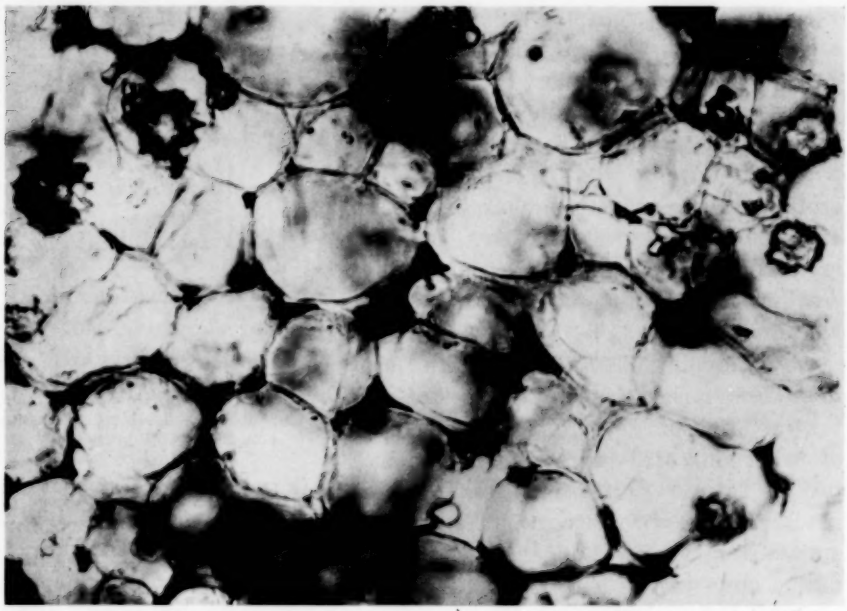


Abb. 4. Nektarium von *Abutilon striatum* DICKS. Die Intercellularen erscheinen durch den Nektar, der sie ausfüllt, schwarz

Phloemsaft handelt. Vergleicht man aber die Zusammensetzung des Nektars mit der des Siebröhrensaftes, so zeigt sich, daß lediglich der Gehalt an Gesamtzucker identisch ist (ZIEGLER 1956). Andere Stoffe, wie z. B. die ninhydrinpositiven Substanzen und die Phosphate sind im Nektar in stark verminderter Konzentration enthalten (ZIEGLER 1956, vgl. auch III/2). Die Nektarien sind also Organe, die speziell für die Zuckersekretion ausgerüstet sind und die andere Stoffe spezifisch zurückzuhalten vermögen. Auf die Frage, wie das Sekretionsgewebe die Kontrolle ausübt, gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Antworten, nämlich einmal eine spezifische Zuckersekretion unter Zurückhaltung der anderen Stoffe, oder aber eine spezifische Rückresorption der Stoffe, die im Siebröhrensaft stärker angereichert sind als im Nektar. Die

Verwirklichung der zweiten Möglichkeit würde also bedeuten, daß der Siebröhrensaft zunächst unverändert austreten kann, und daß dann sekundär verschiedene Stoffe rückresorbiert werden. Für diese Vorgänge kämen die Intercellularen, in die der Nektar zunächst abgeschieden wird, wegen ihrer großen Oberfläche in Frage. Hier läuft auch die Inversion der Nektarsaccharose ab (ZIMMERMANN 1954).

Im Sekretionsgewebe sind sehr häufig zahlreiche und verhältnismäßig große Intercellularen anzutreffen (vgl. Abb. 4 und FREY-WYSSLING u. HÄUSERMANN 1960).

Für die Aminosäuren konnte mit Hilfe von Glutaminsäure-1-C^{14} schon früher eine derartige Rückresorption durch sezernierende Nektarien nachgewiesen werden (ZIEGLER und LÜTTGE 1959). Mit derselben Methode des Autoradiographierens der nach Ablauf der Versuchsdauer (meist etwa 24 Std) gepreßten und gefriergetrockneten Pflanzen konnte mit $P^{32}O_4^{---}$ als Indicator auch eine Rückresorption von anorganischem Phosphat durch sezernierende Nektarien be-

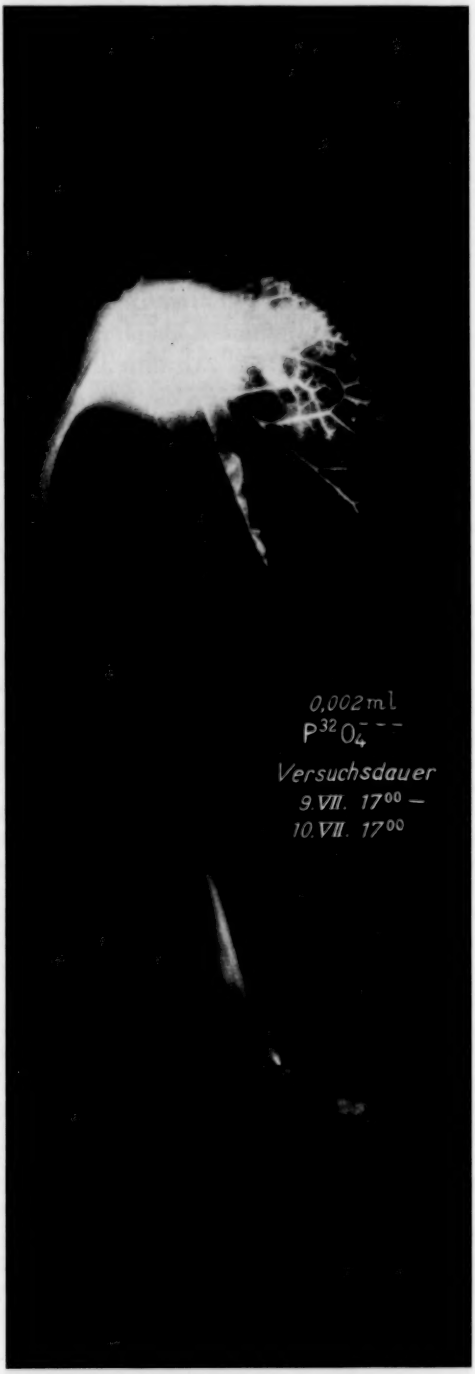


Abb. 5. Keimling von *Ricinus communis* L. Die auf das rechte Nektarium aufgesetzte $P^{32}O_4^{---}$-Lösung hatte am 20. Juni eine spezifische Aktivität von 0,08 mC/ml. Exposition auf AGFA-Röntgenfilm: 20 Tage

obachtet werden. Als Objekte dienten für diese Versuche *Daucus carota* L. und *Ruta graveolens* L. (florale Nektarien) und Keimlinge von *Ricinus communis* L. (extraflorale Nektarien an den Kotyledonen). In Abb. 5 ist die Autoradiographie eines solchen *Ricinus*keimlings gezeigt.

Die Translokation der applizierten Stoffe geht, nachdem sie das Sekretionsparenchym passiert haben, vornehmlich in den Leitbündeln vor sich, was die besonders starke Aktivität in den Nerven der Keimblätter deutlicht macht.

2. *Phosphatstoffwechsel und Saccharosesynthese in den Nektarien.* Ein vieldiskutiertes Problem ist die Frage, in welcher Form die Saccharose, die dem Nektarium zumeist als einziger Zucker durch das Phloem zugeführt wird (WANNER 1952, ZIEGLER 1956), im Nektargewebe selbst wandert.

Nach WANNER könnten die Zucker im parenchymatischen Gewebe in Form der Hexosephosphate verschoben werden. Auch zeigen Befunde von WANNER (1952), daß die Geleitzellen, von ZIEGLER u. HUBER 1960, daß die „Strasburgerzellen" der Gymnospermen und von ZIEGLER (1956), daß die Holzparenchymzellen und auch die Nektarien, die als wichtige „Schaltstationen" des Kohlenhydratstoffwechsels wirken, starke Aktivität der sauren Phosphatase besitzen (vgl. auch FREY-WYSSLING u. HÄUSERMANN 1960). WANNER nimmt an, daß die von diesem Enzym katalysierten Reaktionen in der Hauptsache an den Grenzflächen der einzelnen Zellen ablaufen und so ein Konzentrationsgefälle für die Zuckerphosphate geschaffen wird. Die Ausscheidung der Saccharose im Nektar würde dann so zustande kommen, daß an den Grenzflächen zwischen den Nektarienzellen und den Intercellularen, in die der Nektar zunächst abgeschieden wird, Phosphatabspaltung und Saccharosesynthese ablaufen, ganz analog, wie dies WANNER für die Siebröhren diskutiert. Phosphatmoleküle dienten dann also gewissermaßen als „carrier" für die Hexosen. In den Intercellularen erfolgt dann die Saccharoseabspaltung durch die Invertase (HASSID 1958).

In der Tat konnte MATILE (1956) Glucose-6-phosphat und Fructose-1-phosphat in Nektarien von *Euphorbia pulcherrima* WILLD. nachweisen. Daneben fand er noch wesentlich größere Mengen Saccharosephosphat. Die Saccharosesynthese läuft nun in den grünen Pflanzen wahrscheinlich nach der von BUCHANAN und seinen Mitarbeitern (zitiert nach HASSID 1958) bei Versuchen mit *Chlorella* und *Scenedesmus* gefundenen Enzymreaktion ab, die folgendem Reaktionsschema folgt:

$$\text{UDPG} + \text{Fructose-1-P} \rightleftharpoons \text{Saccharose-P} + \text{UDP}^*$$

Ein Ablauf dieser Reaktion in den Nektarien würde die relativ großen Mengen Saccharosephosphat erklären, die MATILE gefunden hat. Einen Hinweis für das Vorhandensein von UDPG in den Nektarien liefert auch der Befund von MATILE (1956), daß Galaktose durch die Nektarien von *Euphorbia pulcherrima* WILLD. in Glucose umgewandelt werden kann, was wohl auf dem Wege der Galaktowaldenasereaktion erfolgen wird.

Es lag nun nahe, durch einen Nachweis von UDPG im Nektarium diese Vermutung zu stützen. Zu diesem Zweck wurden die isolierten Nektarien von 10 *Abutilon*-Blüten im sezernierenden Stadium auf einen 5%igen Saccharoseagar gesetzt, dem soviel $P^{32}O_4^{---}$ zugegeben wurde, daß er eine spezifische Aktivität von 0,15 mC/ml hatte. Nach 24 Std wurden die Nektarien abgenommen, mit 20 ml 96%igem Äthanol im Potter-Elvehjem-Homogenisator zerkleinert und auf dem Wasserbad bis zum Sieden erhitzt. Dann wurde abzentrifugiert und die über-

* UDP = Uridindiphosphat.

stehende Flüssigkeit im Vakuum bei etwa 45° C von der Hauptmenge des Alkohols befreit und der Rückstand mit distilliertem Wasser wieder aufgenommen. Die Reinigung des Extraktes erfolgte mit Aktivkohle. Zunächst wurden der Lösung zwei Spatel Aktivkohle zugesetzt. Nach 15 min und wiederholtem Umrühren wurde abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit verworfen und die Kohle noch zweimal mit dest. Wasser gewaschen. Dann wurde 15 min lang mit 20 ml 50%igem Äthanol eluiert, zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit im Vakuum bei etwa 45° C auf ein Drittel ihres Volumens eingeengt und mit dest. Wasser wieder aufgefüllt. Sodann wurde die beschriebene Prozedur noch zweimal wiederholt, wobei die Kohlemengen stark reduziert wurden. Das letzte Mal wurde nur noch eine Spatelspitze Aktivkohle zugesetzt und das Eluat (5 ml) im Gefiertrockner bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde mit einem Tropfen Wasser aufgenommen und die Lösung auf ein Chromatogramm aufgetragen.

Auf dem Radioautogramm war nach der Trennung auf der Höhe des UDPG eine deutliche Schwärzung zu erkennen. Die entsprechende Stelle wurde aus dem Chromatogramm ausgeschnitten und mit dem Geigerzähler getestet. Es ergaben sich 189 cpm über dem Nullwert des Papiers. Als Test-UDPG diente ein nach der Vorschrift von Leloir u. Paladini (vgl. Colowick-Kaplan III 1957) hergestelltes Präparat.

Das den Nektarien im Agar angebotene $P^{32}O_4^{---}$ ist also über das UDP in die UDPG eingebaut worden, welche dadurch radioaktiv markiert wurde und so nachgewiesen werden konnte.

3. Zuckerkonzentration des Nektars und Plasmolyse des Sekretionsgewebes. Da der Nektar im allgemeinen nach seiner Ausscheidung noch längere Zeit mit der Oberfläche des Nektariums in Berührung bleibt, muß sich das Nektarium irgendwie gegen die hohe osmotische Wirksamkeit dieser konzentrierten Zuckerlösung schützen.

Nach Huber (1956) soll die Ausscheidungskonzentration des Nektars nicht über 30% liegen, da Plasmolyseversuche mit Rohrzuckerlösungen Grenzplasmolysewerte von dieser Höhe für das Sekretionsgewebe ergaben. Erst durch postsekretorische Eindickungsvorgänge soll dann die Endkonzentration des Nektars erreicht werden. Dies ändert aber nichts an dem Problem, daß letztlich ein starkes Osmotikum mit dem Sekretionsgewebe in unmittelbarem Kontakt steht. Außerdem sei darauf hingewiesen, daß es hierbei nicht auf den Prozentsatz an Gesamtzucker ankommt, sondern vielmehr darauf, wieweit die Nektarsaccharose bereits invertiert ist, also auf die Molarität des Nektars.

Die vom Verfasser mit Rohrzucker durchgeführten Plasmolyseversuche ergaben ebenfalls verhältnismäßig niedrige Grenzplasmolysewerte. Es wurden hierbei nach der allgemein üblichen Methode nicht zu dünne Schnitte — um möglichst wenige Nektartrichome zu verletzen — der Kelchblattnektarien von *Abutilon striatum* Dicks. in Rohrzuckerlösungen verschiedener Konzentration eingebracht und nach 1 Std auf Plasmolyse untersucht. Für voll geöffnete Blüten, deren Grund mit Nektar erfüllt war, wurde eine Grenzplasmolyse im Durchschnitt mit einer 0,62 molaren, also 21,2%igen, Rohrzuckerlösung erhalten. Das entspricht nach der von Walter (1931) angegebenen Tabelle einem

osmotischen Wert von 18,50 Atmosphären. Für Knospen von etwa 22 mm Länge und 11 mm Breite lagen die Werte noch etwas höher, nämlich bei 0,71 molar (= 24,3% bzw. 21,88 Atmosphären).

Kryoskopische Bestimmungen des Nektars selbst lieferten ganz andere Werte. Dabei mußte für jede Bestimmung der Nektar mehrerer Blüten zusammengegeben werden, da sonst die Mengen zu gering gewesen wären. Es wurden mehrere Proben getestet, so daß die angegebenen Zahlen Durchschnittswerte darstellen. Für *Musa*-Nektar wurde eine Gefrierpunktserniedrigung von 2,56° C und für *Abutilon*-Nektar eine solche von 3,03° C gemessen. Mit der Umrechnungsformel $P_{20} = 12{,}92 \cdot \Delta$ (Brauner 1932) erhält man für *Musa*-Nektar einen osmotischen Wert von 33,08 und für *Abutilon*-Nektar von 39,15 Atmosphären. Vergleicht man diese Werte noch mit der genannten Tabelle, so sieht man, daß die osmotische Wirkung des *Musa*-Nektars der einer 0,97 molaren (= 33,2%igen) und die des *Abutilon*-Nektars der einer 1,09 molaren (= 37,3%igen) Rohrzuckerlösung entspricht.

Es läßt sich nun aber leicht zeigen, daß die Drüsenzellen auch in Berührung mit dem Nektar nicht plasmolysiert sind, wenn man die Nektarien nektargefüllter *Abutilon*-Blüten schneidet und sofort auf einem Objektträger in einem Tropfen des Nektars mikroskopiert. Läßt man die Schnitte nun 1 Std lang im Nektar in einer geschlossenen Schale — um Eindickungsvorgänge zu vermeiden — liegen, so zeigen sie alle Plasmolyse. Dieser einfache Versuch, der mehrfach reproduziert werden konnte, zeigt, wie wenig man hier mit Plasmolyseversuchen weiterkommen kann. Eine fundierte Erklärung für das Ausbleiben der Plasmolyse beim intakten Nektarium kann derzeit nicht gegeben werden.

V. Besprechung der Ergebnisse

Zucker bilden den weitaus größten Teil des Nektartrockengewichtes (etwa 95% im Falle des vom Verfasser eingehend analysierten *Musa*-Nektars). Zumeist handelt es sich um Saccharose, Glucose und Fructose, nicht selten finden sich auch Oligosaccharide. Da in Fällen, in denen der Nektar keine Invertaseaktivität aufweist, Saccharose als einziger Zucker auftritt, da ferner häufig (vgl. Maurizio 1959, 1960), auch in dem von uns daraufhin geprüften Nektar, Glucose und Fructose in gleichem molaren Verhältnis auftreten und zudem die Konzentration der Monosen vom Zeitpunkt des Nektaraustritts aus den Drüsenintercellularen an die Drüsenoberfläche an auf Kosten der Saccharose ständig zunimmt, ist anzunehmen, daß die Saccharose gewöhnlich den eigentlichen Sekretionszucker darstellt, der erst sekundär — nach der Sekretion — Veränderungen erleiden kann. Auch die Bildung der Oligosaccharide kann auf die enzymatische Rohrzuckerzerlegung zurückgeführt werden, sofern man dabei eine Gruppenübertragung durch eine Transglucosidase

oder eine Transfructosidase annimmt (FREY-WYSSLING, ZIMMERMANN u. MAURIZIO 1954, ZIMMERMANN 1954).

Da die Kohlenhydrate in der Regel schon als Saccharose in den Leitbahnen von den Orten ihrer Bildung oder Mobilisierung an die Nektarien herangeführt werden, können sie ohne weiteren Umbau ausgeschieden werden. Die Sekretion selbst ist ein aktiver Vorgang, bei dem vermutlich Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsmechanismen beteiligt sind. Möglicherweise wird die Wandersaccharose bei der Entnahme aus den Leitbündeln phosphoryliert, als Saccharosephosphat im Drüsengewebe verschoben und bei der Abscheidung dephosphoryliert; es könnten auf diese Weise die nötigen Konzentrationsgefälle in der Wanderrichtung zustande kommen. Für diese Vorstellung sprechen der Nachweis von Saccharosephosphat im Nektargewebe (MATILE 1956), die Aktivität der Phosphatase in der Drüse, des Fermentes also, das die Saccharose aus dem Saccharosephosphat in Freiheit setzt (ZIEGLER 1955, 1956; FREY-WYSSLING und HÄUSERMANN 1960) und die Abhängigkeit der Sekretionstätigkeit von der Atmung (ZIEGLER 1955, 1956; MATILE 1956; BROWN 1959; SHUEL 1959), denn die bei der Rohrzuckerphosphorylierung verbrauchte ATP muß ja wieder regeneriert werden.

Nicht immer aber dürfte die Beziehung zwischen dem Wanderzucker und dem sezernierten Zucker so einfach liegen; z. T. speichern die Nektariengewebe reichlich Stärke, die offenbar ebenfalls zur Deckung des Zuckerbedarfes bei der Sekretion herangezogen werden kann. Da bei ihrer Mobilisierung (durch Phosphorolyse) zunächst Hexophosphate entstehen, muß vor der Abscheidung eine Saccharosesynthese stattfinden. Daß die Nektarien dazu fähig sind, haben die Fütterungsversuche von FREY-WYSSLING, ZIMMERMANN und MAURIZIO (1954) und SHUEL (1956) mit Hexosen einwandfrei gezeigt.

Der vom Verfasser für *Abutilon*-Nektarien geführte Nachweis von UDPG läßt vermuten, daß die Rohrzuckersynthese nach dem von BUCHANAN u. Mitarb. beschriebenen Mechanismus vor sich geht; wahrscheinlich ist dies auch der Syntheseweg der Saccharose im Phloem (ZIEGLER 1960). Einen schlüssigen Beweis für diese Annahme können diese Ergebnisse allerdings noch nicht liefern.

Die Tatsache, daß durch die Nektarien ganz vorwiegend Zucker abgeschieden wird, hat zu der Vorstellung geführt, daß es sich dabei primär um eine lokale Entfernung überschüssiger Kohlenhydrate handele (FREY-WYSSLING 1935). Die wichtige Rolle des Nektars für die Anlockung der bestäubungsvermittelnden Insekten ist sicher eine sekundäre Entwicklung: Die Nektarien sind phylogenetisch älter als die Blüten — sie finden sich bereits bei den blütenlosen Farnen (FREY-WYSSLING 1949). Mit *Photinopteris speciosa* J. SM. konnte in dieser Arbeit eine neue Farngattung mit Nektarien festgestellt werden. Der

Befund, nach dem die Nektarsekretion bei den extrafloralen Nektarien von *Viburnum opulus* L. nicht nur zur Zeit des Entfaltungsabschlusses der Blätter sondern während der ganzen Vegetationsperiode anhält, ist mit der erwähnten „Saftventiltheorie" kaum in Einklang zu bringen.

Der einzige Unterschied zwischen den extrafloralen und den floralen Nektarien besteht darin, daß letztere eine biologische Bedeutung für die Insektenbestäubung erlangt haben. Darüber hinaus lassen sich weder anatomische noch physiologische Unterscheidungsmerkmale finden. Es muß bezweifelt werden, daß die laufende Absonderung der unter großem strukturellen und fermentativen Aufwand in der Photosynthese synthetisierten Assimilate bei den extrafloralen Nektarien überhaupt einen „Sinn" hat.

Die vorliegenden Untersuchungen unterstreichen nachdrücklich, daß im Nektar neben dem mengemäßig weit überwiegenden Zucker eine ganze Reihe von Stoffen abgeschieden wird. Dies läßt erkennen, daß es sich bei der Nektarsekretion nicht nur um eine spezifische Zuckerabscheidung, sondern um einen polaren Austritt zahlreicher — unter Umständen sogar aller löslichen — Zellinhaltsstoffe handelt. Dafür spricht auch das Auftreten recht ungewöhnlicher Verbindungen wie etwa der Ureide in Fällen, wo sich diese Substanzen auch im Siebröhrensaft finden (*Acer*-Arten).

Nicht zu übersehen sind aber doch die Unterschiede in der Zusammensetzung des Nektars gegenüber dem die Drüsen versorgenden Transportsaft; sie äußern sich vor allem darin, daß im Nektar die Stickstoff- und Phosphorverbindungen gegenüber den Kohlenhydraten zurücktreten. Wir haben es hier zweifellos mit einer spezifischen Leistung der Drüse zu tun.

Die Frage, ob das Ausmaß dieser Verarmung des Nektars irgendwie mit dem Grad der histologischen Differenzierung des Nektariums parallel geht, kann nach den vorliegenden Untersuchungen dahin beantwortet werden, daß zweifelsohne derartige Zusammenhänge bestehen: Die strukturell primitivsten Nektarien zeigen noch relativ hohe Stickstoffgehalte im Nektar, während die höchst entwickelten Nektarien fast reine Zuckerlösungen ausscheiden. Daß sich im Bananennektar trotz der hohen Differenzierung des Nektariums eine relativ hohe Stickstoff- und Phosphatkonzentration findet, ist vielleicht auf das Vorhandensein und die Tätigkeit der Mikroorganismen im Sekret zurückzuführen; dadurch, daß die Mikroorganismen diese Stoffe in ihre Zellen — die ja in die Analyse eingingen — aufnehmen, kann ein stärkeres Konzentrationsgefälle zwischen dem Drüsengewebe und dem Nektar aufrechterhalten werden und so können größere Gesamtmengen dieser Substanzen zur Abscheidung kommen.

Die bisherige Betrachtung hat bereits wahrscheinlich gemacht, daß die Verarmung des Nektars an Stickstoff- und Phosphatverbindungen

gegenüber dem Siebröhrensaft nicht auf einer Filtrationsleistung der Drüse beruht, sondern durch spezifische Rückresorption bestimmter Stoffgruppen zustande kommt, ähnlich wie dies für die Wirbeltierniere nachgewiesen ist. Diese Vorstellung wird durch die geschilderten Versuche direkt gestützt, in denen durch sezernierende Nektarien markierte C^{14}- bzw. P^{32}-Verbindungen resorbiert und den Leitbahnen im Inneren der Pflanze zugeführt werden. Es wäre allerdings wünschenswert, noch einen quantitativen Vergleich der Lage der Abscheidungs- und Resorptionsgleichgewichte für die verschiedenen Stoffgruppen anzustellen. Es ist dies methodisch zwar schwierig, aber nicht unlösbar.

In den Untersuchungen zur Analyse des Nektarienstoffwechsels hat sich die Verwendung von isolierten Nektarien als sehr nützlich erwiesen. Daß bei der hierbei erfolgenden Präparation aber wesentliche Veränderungen des ursprünglichen Sekretionsverhaltens eintreten können — eine Möglichkeit, die prinzipiell berücksichtigt werden muß —, zeigt besonders auffällig das Beispiel der Sekretion „schwarzen Nektars", d. h. der Melaninbildung durch isolierte *Lathraea*-Nektarien. Während die zur Pigmentsynthese notwendigen Enzyme schon im Sekret der unverletzten Drüse abgeschieden werden, kommt es erst unter dem Einfluß der Isolierung zur Ausscheidung des Enzymsubstrates.

Durch die Verarmung des Nektars an Stickstoff- und Phosphorverbindungen wird das C/N- bzw. C/P-Verhältnis für die tierische Ernährung noch ungünstiger, als es auch im Siebröhrensaft schon ist. Während infolgedessen die phloemsaugenden Insekten noch ausschließlich vom Siebröhrensaft leben und das C/N-Verhältnis nur durch reichliche Ausscheidung fast stickstofffreien Kotes („Honigtau") zugunsten des Stickstoffes ausbalancieren können, benötigen die Nektarsammler zusätzliche Stickstoffnahrung, wofür die Bienen bekanntlich vorwiegend Pollen benützen. Immerhin ist aber der Nektar eine sehr vielfältig zusammengesetzte Lösung (vgl. die Übersicht für den *Musa*-Nektar S. 200), wobei auch jetzt zweifellos noch nicht alle Komponenten erfaßt sind.

Eine vollständige Analyse eines typischen Bienennektars (z. B. Klee, Linde, Robinie, *Calluna* u. a.), die vor allem auch die Vitamine und die Duftstoffe umfassen müßte, könnte von erheblicher praktischer Bedeutung werden: Sie könnte die Imker in die Lage versetzen, die Bienen durch ein dem natürlichen Nahrungssubstrat entsprechendes Futter optimal und gleichmäßig zu versorgen. Dies wird in Zukunft für eine ausreichende Honigproduktion um so notwendiger werden, als durch die zunehmende Verwendung von Insektiziden die Bienen bei ihren Trachtflügen immer stärker gefährdet sind.

Ein interessantes Problem, das sich in diesem Zusammenhang stellt, ist die Frage nach den Umsetzungen bei der Umwandlung des Nektars in den Honig durch die Bienen. Hier sind vorläufig nur recht grobe

Gesetzmäßigkeiten bekannt, so etwa die weiterlaufende Inversion der Nektarsaccharose (vgl. MAURIZIO 1959, GONTARSKI 1960). Dabei ist aber die Zusammensetzung des Honigs infolge seiner praktischen Bedeutung, und dadurch, daß er in größeren Mengen anfällt, sehr viel besser untersucht als die des Nektars (Literatur bei GOLDSCHMIDT u. BURKERT 1955).

Zusammenfassung

1. In einigen Nektarsorten wurden Glucose, Fructose und Saccharose als einzige Zucker nachgewiesen; im *Paeonia*-Sekret darüber hinaus ein Oligosaccharid. Im Nektar von *Centaurea montana* L. fand sich nur Saccharose, Gesamt-Glucose und Gesamt-Fructose kommen in dem hierfür analysierten *Musa*-Nektar in äquimolaren Mengen vor.

2. Die Menge der ninhydrinpositiven Substanzen im Nektar nimmt mit zunehmender anatomischer Differenzierung der Nektarien ab. Es wurden im Nektar verschiedene Aminosäuren nachgewiesen; beim Ahorn fanden sich darüber hinaus die Ureide Allantoin und Allantoinsäure. Der *Musa*-Nektar enthält reichliche Mengen mikrobielles Protein.

3. Neben den Aminosäuren wurden noch andere kurzkettige organische Säuren, nämlich einige Dicarbonsäuren, die Citronensäure und zwei Zuckersäuren chromatographisch im Nektar nachgewiesen.

4. Titrations- und p_H-Messungen zeigen, daß der Nektar ein stark gepuffertes System darstellt.

5. Für *Musa*-Nektar wurden genaue Phosphatbestimmungen durchgeführt.

6. Im Nektar von *Lathraea* wurde eine Tyrosinase gefunden.

7. Für $P^{32}O_4^{---}$ wurde bei verschiedenen Nektarien während der Sekretionsphase eine Rückresorption aus dem Nektar in die Leitbahnen im Innern der Pflanzen gezeigt.

8. Mit Hilfe der Tracermethode wurde in *Abutilon*-Nektarien Uridindiphosphatglucose (UDPG) nachgewiesen.

9. Der Nektar von *Abutilon* ist hypertonisch gegenüber den Zellen des Nektariums; trotzdem ist das Drüsengewebe in situ nicht plasmolysiert.

Literatur

AGTHE, C.: Über die physiologische Herkunft des Pflanzennektars. Ber. schweiz. bot. Ges. **61**, 240—274 (1951).

BELOSERSKI, A. N., u. N. I. PROSKURJAKOW: Praktikum der Biochemie der Pflanzen. Berlin 1956.

BEUTLER, R.: Biologisch-chemische Untersuchungen am Nektar von Immenblumen. Z. vergl. Physiol. **12**, 72—176 (1930).

BONNIER, G.: Les Nectaires. Ann. Sci. natur., VI. Ser. Bot. **8**, 5—212 (1878).

BRAUNER, L.: Pflanzenphysiologisches Praktikum, Bd. II. Jena: Gustav Fischer 1932.

BROWN, H. D.: Effects of respiratory inhibitors upon nectar secretion in *Antirrhinum*. Bull. Torrey bot. Club **86**, (5) 290—295 (1959).

Bukatsch, F., u. G. Wildner: Ascorbinsäurebestimmung in Nektar, Pollen, Blütenteilen und Elaiosomen mit Hilfe einer neuen Mikromethode. Phyton **7**, (1) 37—46 (1956).

Buxbaum, F.: Zur Frage des Eiweißgehaltes des Nektars. Planta (Berl.) **4**, 818—821 (1927).

Colowick, S. P., and N. O. Kaplan: Methods in Enzymology, vol. III. New York: Academic Press Inc. 1957.

Cramer, F.: Papierchromatographie. Weinheim: Verlag für Chemie 1958.

Darwin, F.: On the nectar-glands of common brake fern (*Pteris aquilina*). J. Linnean Soc. **15**, 407 (1877).

Daumann, E.: Blütennektarium von Nepenthes. Beih. bot. Zbl. A **47**, 1—14 (1931).

Dold, H.: Über antibakterielle Hemmstoffe (Inhibine) im Naturhonig. Imkerfreund **1947**, 41—43.

Dümmer, R.: Grape sugar as a secretion in *Platycerium*. Ann. Botany **25**, 1205—1206 (1911).

Ewert, R.: Die Nektarien in ihrer Bedeutung für Bienenzucht und Landwirtschaft. Leipzig: Verlag der Leipziger Bienenzeitung 1932.

Figdor, W.: Über die extranuptialen Nektarien von *Pteridium aquilinum*. Öst. bot. Z. **41**, 293—295 (1891).

Frey-Wyssling, A.: Die Stoffausscheidung der höheren Pflanzen. Berlin: Springer 1935.

—, Stoffwechsel der Pflanzen. Zürich: Büchergilde Gutenberg 1949.

—, u. C. Agthe: Nektar ist ausgeschiedener Phloemsaft. Verh. schweiz. naturforsch. Ges. **1950**, 175—176.

—, u. E. Häusermann: Deutung der gestaltlosen Nektarien. Ber. schweiz. bot. Ges. **70**, 150—162 (1960).

—, M. Zimmermann u. A. Maurizio: Über den enzymatischen Zuckerumbau in Nektarien. Experientia (Basel) **10**, 490—491 (1954).

Goldschmidt, S., u. H. Burkert: Über das Vorkommen einiger im Bienenhonig bisher unbekannter Zucker. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **300**, 188—200 (1955).

Gontarski, H.: Der Honig als Nahrung der Biene und seine Entstehung. In A. Büdel u. E. Herold, Biene und Bienezucht. München: Ehrenwirth 1960.

Hassid, W. Z.: The synthesis and transformation of the oligosaccharids in plants, including their hydrolysis. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. VI. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.

Heitefuss, R.: Erfahrungen zur quantitativen papierchromatographischen Bestimmung von organischen Säuren. Z. angew. Bot. **31**, 61—62 (1957).

Huber, H.: Die Abhängigkeit der Nektarsekretion von Temperatur, Luft- und Bodenfeuchtigkeit. Planta (Berl.) **48**, 47—98 (1956).

Linskens, H. F.: Papierchromatographie in der Botanik. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.

Lloyd, F. E.: The extra-nuptial nectaries of the common brake, *Pteridium aquilinum*. Science **12**, 885—890 (1901).

Matile, P.: Über den Stoffwechsel und die Auxinabhängigkeit der Nektarsekretion Ber. schweiz. bot. Ges. **66**, 237—266 (1956).

Orr, M. Y.: The leaf glands of *Dioscorea macrura* Harms. Bot. Zbl. **146**, 291 (1924).

Maurizio, A.: Papierchromatographische Untersuchungen an Blütenhonigen und Nektar. Ann. de l'Abeille **1959**, 291—341.

—, Bienenbotanik. In A. Büdel, u. E. Herold, Biene und Bienenzucht. München: Ehrenwirth 1960.

PAECH, K.: Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1950.

—, u. M. V. TRACEY: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. II u. IV. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.

PLANTA, A. v.: Die Zusammensetzung einiger Nektararten. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **10**, 227—247 (1886).

SCHNIEWIND-THIES, J.: Beiträge zur Kenntnis der Septalnaktarien. Jena: Gustav Fischer 1897.

SHUEL, R. W.: Some factors affecting nectar secretion in red clover. Plant Physiol. **27** (1), 95—110 (1952).

—, Studies of nectar secretion in exised flowers. Canad. J. Bot. **34**, 142—153 (1956).

—, Studies of nectar secretion in exised flowers. II. The influence of certain growth regulators and enzyme inhibitors. Canad. J. Bot. **37**, 1167—1180 (1959).

VIS, J. H.: The histochemical demonstration of acid phosphatase in nectaries. Acta bot. neerl. **7**, 124—130 (1958).

WALTER, H.: Die Hydratur der Pflanze. Jena: Gustav Fischer 1931.

WANNER, H.: Phosphataseverteilung und Kohlenhydratstoffwechsel in der Pflanze. Planta (Berl.) **41**, 190—194 (1952).

WEBER, F.: Vitamin C im Nektar von *Fritillaria imperialis*. Protoplasma **36** (4), 613—615 (1942).

—, *Impatiens*nektar. Phyton **3** (1 u. 2), 110—112 (1951).

WILLSTÄTTER, R., u. G. SCHUDEL: Bestimmung von Traubenzucker mit Hypojodit. Ber. dtsch. chem. Ges. **51** (1), 780—781 (1918).

YOUNG, E. G., and C. F. CONWAY: Estimation of Allantoin. J. biol. Chem. **142**, 841—847 (1942).

ZIEGLER, H.: Phosphataseaktivität und Sauerstoffverbrauch des Nektariums von *Abutilon striatum* DICKS. Naurwissenschaften **42**, 259 (1955).

—, Untersuchungen über die Leitung und Sekretion der Assimilate. Planta (Berl.) **47**, 447—500 (1956).

—, Über den Nachweis von Uridindiphosphatglucose (UDPG) im Phloem von *Heracleum Mantegazzianum* SOMM. et LEV. Naturwissenschaften **47**, 140 (1960).

— u. F. HUBER: Phosphataseaktivität in den „Strasburger-Zellen" der Koniferennadeln. Naturwissenschaften **47**, 305 (1960).

— u. U. LÜTTGE: Über die Resorption von C^{14}-Glutaminsäure durch sezernierende Nektarien. Naturwissenschaften **46**, 176—177 (1959).

—, u. M. SCHNABEL: Über Ureide im Siebröhrensaft. Flora (Jena) (im Druck).

ZIMMERMANN, J. G.: Über die extrafloralen Nektarien der Angiospermen. Beih. bot. Zbl. A **49**, 99—196 (1932).

ZIMMERMANN, M.: Papierchromatographische Untersuchungen über die pflanzliche Zuckersekretion. Ber. schweiz. bot. Ges. **63**, 402—429 (1953).

— Über die Sekretion saccharosespaltender Transglucosidasen im pflanzlichen Nektar. Experientia (Basel) **9** (3), 145—149 (1954).

Dr. U. LÜTTGE,
Darmstadt, Botanisches Institut der T. H.,
Roßdörferstraße 140

Planta 56, 213—228 (1961)

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin
und dem Botanischen Institut der Universität Marburg

LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DESMIDIACEEN

I. Mitteilung

ZELLWAND- UND GALLERTSTRUKTUREN BEI EINIGEN ARTEN

Von

HORST DRAWERT und INGEBORG METZNER-KÜSTER

Mit 32 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Oktober 1960)

1. Einleitung

Bei einigen beweglichen Arten der Cyanophyceen konnten wir elektronenmikroskopisch in den Quer- und in den Außenwänden Poren nachweisen. In den Außenwänden war neben einer unregelmäßigen Anordnung immer eine gesetzmäßige Verteilung der Poren in Form von Ketten oder Gürteln beiderseits der Ansatzstellen der Querwände anzutreffen (METZNER 1955, DRAWERT u. METZNER 1956, 1958a, b). Wieweit diese Poren mit der Bildung der Scheide und mit dem Bewegungsmechanismus der Cyanophyceen im Zusammenhang stehen, ist noch unbekannt. Um Anhaltspunkte und Anregungen zur Klärung dieser Vorgänge zu gewinnen, führen wir seit 1955 auch Untersuchungen an Desmidiaceen durch.

Die Größenordnung der Poren liegt bei dieser Algengruppe z. T. noch im lichtmikroskopischen Bereich, außerdem sind wir besonders durch die Arbeiten von KLEBS (1885, 1886), HAUPTFLEISCH (1888), SCHRÖDER (1902), LÜTKEMÜLLER (1902) und VAN WISSELINGH (1912) über die mikroskopische Struktur ihrer Zellwände, des Porensystems, der Hüll- und Bewegungsgallerten besser unterrichtet als bei den Cyanophyceen (vgl. die Zusammenfassungen bei OLTMANNS 1922, KRIEGER 1937, CZURDA 1937, FRITSCH 1948, SCHUSSNIG 1960). Über das Verhalten der Zellwände und Gallerten von Desmidiaceen bei Vitalfärbung liegen aus neuerer Zeit Untersuchungen von HÖFLER und seiner Schule vor (z. B. HÖFLER u. SCHINDLER 1952, HÖFLER 1957, KINZEL 1953).

Auch in anderer Beziehung sind die Desmidiaceen ein sehr lohnendes Objekt. Hier sei nur auf den besonderen Modus der Zellteilung hingewiesen, der eine gute Untersuchung des Membranwachstums gestattet. Ferner fehlt den Desmidiaceen im Entwicklungsgang sehr wahrscheinlich das Stadium der Proplastiden. Das Verhalten der Plastiden und ihrer Struktur bei der Zygotenbildung und Zygotenkeimung ist noch weit-

gehend ungeklärt. Von besonderem Interesse ist auch der Vorgang der Einwanderung der großen Chromatophoren in die jungen Zellhälften und ihre anschließende Teilung bei der vegetativen Vermehrung.

Bei unseren Untersuchungen an Desmidiaceen haben wir uns deshalb nicht nur auf die Strukturen von Zellwand und Gallerte beschränkt, sondern auch den Protoplasten mit seinen Einschlüssen einbezogen mit dem Endziel, Beziehungen zwischen Struktur und Funktion zu finden. Von diesem Endziel sind wir allerdings noch weit entfernt, so daß wir bisher nur ein recht lückenhaftes Bild entwerfen können, und ein Teil der vorgetragenen Ansichten wird im Verlauf der weiteren experimentellen Arbeit revidiert werden müssen. Wir glauben jedoch, eine Veröffentlichung verantworten zu können, da unsere bisherigen Beobachtungen und Schlußfolgerungen vielleicht zu einer klärenden Diskussion beitragen könnten, zumal auch an anderen Stellen mit Conjugaten in ähnlicher Richtung gearbeitet wird und inzwischen Mitteilungen erschienen sind, die mit unseren Untersuchungsergebnissen und deren Deutungen zum Teil übereinstimmen, zum Teil aber auch eine Diskussion erfordern.

2. Methodik

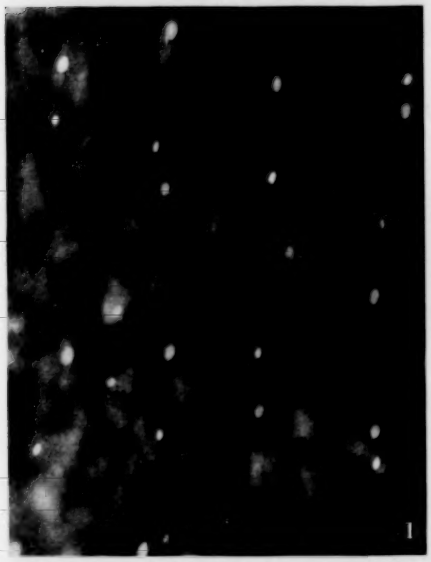
Für die Untersuchungen wurden vorwiegend folgende Desmidiaceen benutzt: *Micrasterias rotata* (GREV.) RALFS, *Euastrum oblongum* (GREV.) RALFS, *Cosmarium* spec., *Closterium moniliferum* (BORY) EHRBG., *Hyalotheca dissiliens* (SM.) BRÉB. Zum Vergleich wurden noch *Pleurotaenium trabecula* (EHRBG.) NÄG., *Tetmemorus laevis* (KÜTZ) RALFS und einige weitere, nicht näher bestimmte *Closterium*-Arten herangezogen.

Zur Färbung für die lichtmikroskopischen Untersuchungen dienten Methylviolett, Methylenblau und Nilblau 0,01%ig in Leitungswasser gelöst sowie 0,1%ige Rutheniumrotlösung in Aqua dest. Ferner benutzten wir Tuschesuspensionen nach SCHRÖDER (1902) zum Nachweis von Schleim. Die Beobachtung erfolgte mit dem W- bzw. WL-Stativ von C. Zeiss (Oberkochen) mit und ohne Phasenkontrast.

Zum Abbau des Zellinhaltes und zur Entfernung der Inkrusten für die elektronenmikroskopischen Zellwanduntersuchungen verwendeten wir Eau de Javelle, Perhydrol bei verschiedenen Temperaturen, 10—50%ige Chromsäure oder kochten die Zellen in 6%iger Salzsäure. Zur Herstellung von Schnitten (Glasmesser) mit den Ultramikrotomen nach SJÖSTRAND oder nach VOGELL wurden die Zellen in 1%iger OsO_4-Lösung mit $p_H \sim 7$, zum Teil auch in 0,6%iger $KMnO_4$-Lösung mit $p_H \sim 7$ fixiert und in Methacrylat, einige auch in Vestopal, eingebettet. Für die Untersuchungen stand uns sowohl in Berlin als auch in Marburg ein Siemens-Stativ Typ Elmiskop II zur Verfügung.

3. Die submikroskopische Struktur der ausgewachsenen Zellwände von *Micrasterias*, *Cosmarium*, *Euastrum* und *Closterium*

Nach den Untersuchungen der älteren Autoren besteht die Zellwand der Desmidiaceen aus mindestens zwei Schichten. Der Cellulosegehalt soll von innen nach außen abnehmen. Bei den Begleitstoffen handelt es sich wohl um pektinartige Substanzen. Über die submikroskopische Struktur der Zellwände von *Micrasterias papillifera*, *Cosmarium Lundelii* und *Closterium acerosum* liegen Angaben von CHARDARD u. ROUILLER



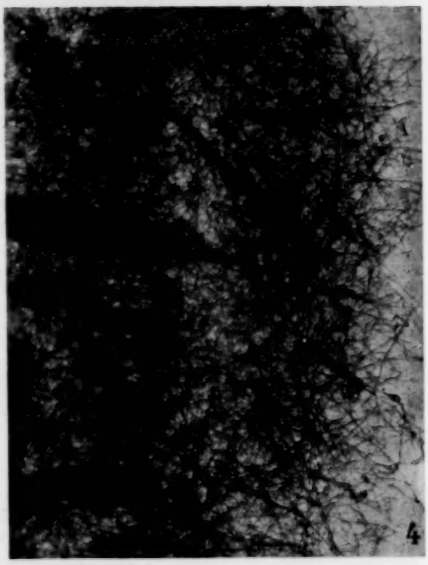


Abb. 1. *Micrasterias rotata.* Zellwand 3 Std mit Perhydrol bei 60° C behandelt. Poren sichtbar. Porenweite 130—200 mμ. Vergr. 7600

Abb. 2. *Micrasterias rotata.* Poren und fibrilläre Struktur der Zellwand nach 16 Std Behandlung mit 20 %iger Chromsäure. Die fibrilläre Struktur ist noch z. T. durch amorphe Inkrusten verdeckt. Vergr. 7600

Abb. 3. *Micrasterias rotata.* Fibrilläre Struktur der Zellwand nach 16 Std Behandlung mit 30 %iger Chromsäure. Vergr. 7600

Abb. 4. *Cosmarium* spec. Fibrilläre Struktur der Zellwand nach 16 Std Behandlung mit 30 %iger Chromsäure. Vergr. 7600

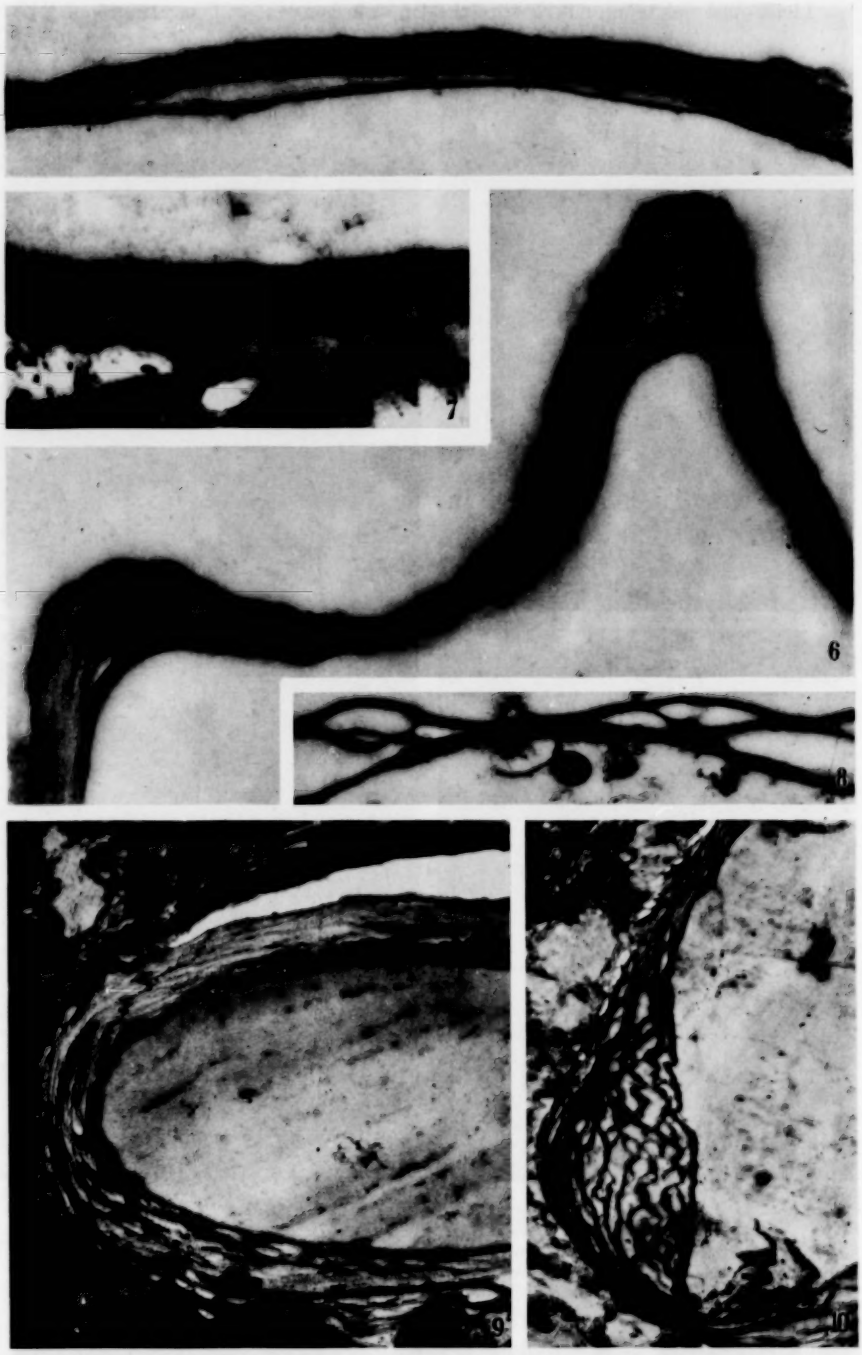


Abb. 5. *Micrasterias rotata*. Schnitt durch die Zellwand. Die Zellwand läßt einen lamellären Bau erkennen. Vergr. 7500, auf 22500 nachvergr. (Aufnahme D. ECKHARDT)

Abb. 6—10. Legenden nebenstehend

(1957) vor, die sich auf Untersuchungen an Schnitten beziehen. Danach kann man elektronenmikroskopisch keine Zweischichtigkeit der 200—250 mμ dicken Zellwand erkennen, wie sie von den älteren Autoren lichtmikroskopisch beobachtet worden ist. Die Wände von *Micrasterias* und *Cosmarium* sollen sich aus vielen submikroskopischen Lamellen zusammensetzen, von denen die innerste und die äußerste mit einer Dicke von 16 mμ am deutlichsten hervortreten, da sie dichter sind. Der Zwischenraum wird von weiteren Lamellen eingenommen, die sich aus einer granulären Substanz aufbauen und schwer von einer nur schwach osmiophilen Inkruste zu unterscheiden sind. Bei *Closterium* sind ebenfalls eine innere und eine äußere Lamelle zu erkennen, während der Zwischenraum mit einer Dicke von 400 mμ von einer granulären homogenen, schwach osmiophilen Substanz ausgefüllt wird.

CHARDARD u. ROUILLER nehmen an, daß die Angabe von einer Zweischichtigkeit der Desmidiaceenwand auf eine optische Täuschung zurückzuführen ist. Sie vermuten, daß z. B. LÜTKEMÜLLER den im Lichtmikroskop auftretenden Halo um die Zellen für eine Wandschicht gehalten hat. Wir können uns dieser Meinung nicht anschließen; denn LÜTKEMÜLLER und die anderen älteren Desmidiaceenforscher haben selbst im Grenzbereich des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskopes noch mit einer Genauigkeit beobachtet, daß wir dieser Leistung nur unsere größte Bewunderung entgegenbringen können und es undenkbar ist, daß sie einen Halo für eine Zellwandschicht gehalten haben sollen. Dies ist auch deshalb schon sehr unwahrscheinlich, weil die Zellwand bei den meisten Formen nicht die äußerste Zellgrenze darstellt, sondern noch von einer Hüllgallerte umschlossen wird. Ferner ist auch nicht einzusehen, daß CHARDARD u. ROUILLER (1957, S. 159) betonen: «La présence d'une seule couche cellulaire est extrêmement importante du point de vue systématique. En effet, la division des Desmidiées en Saccodermes et Placodermes, est basée sur la structure de la membrane: une seule couche sans pore chez les Desmidiées saccodermes et deux couches (ou plus) traversées généralement par des pores chez les Desmidiées placodermes.» Die Unterscheidung beruht doch weniger auf der Ein- oder Mehrschichtigkeit der Zellwand als vielmehr darauf, daß die Saccodermae eine geschlossene Zellwand besitzen, während sich die Placodermae aus zwei ungleich alten Schalenhälften zusammensetzen. Außerdem ist die Einschichtigkeit der Zellwand der Saccodermae umstritten, so schreibt CZURDA (1937, S. 19): „Die Membran der Desmidiales ist im allgemeinen dünn und ebenfalls zweischichtig. ... Die Zellschichten zeigen das gleiche mikroskopische Verhalten wie jene der Zygnemales und Mesotaeniales", also der Placodermae. Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß die Angaben von CZURDA leider sehr unzuverlässig sind und einer Nachprüfung bedürfen.

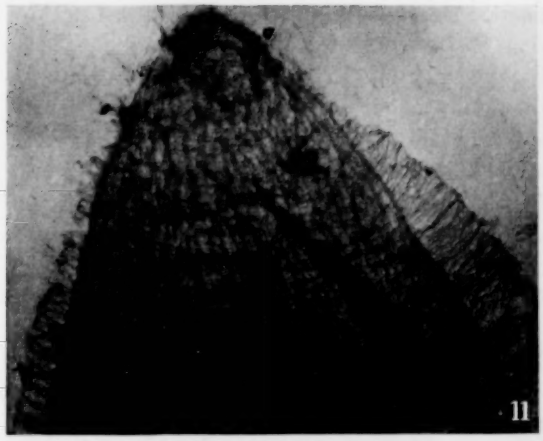
Abb. 6. *Micrasterias rotata*. Schnitt durch die Zellwand am Ende eines Lappens. Vergr. 15000, auf 22500 nachvergr. (Aufnahme D. ECKHARDT)

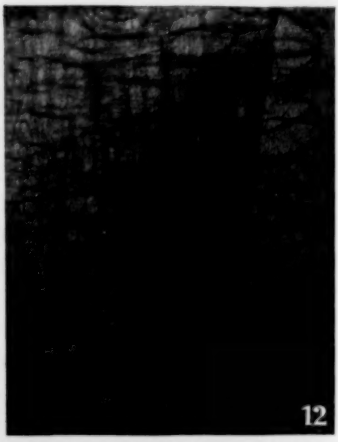
Abb. 7. *Micrasterias rotata*. Schnitt durch die Zellwand. Andeutung einer Zweischichtigkeit. Vergr. 7500, auf 22500 nachvergr. (Aufnahme D. ECKHARDT)

Abb. 8. *Micrasterias rotata*. Schnitt durch die Zellwand. In der Mitte ist ein Porenapparat angeschnitten. Zu beiden Seiten des Porenapparates ist die Zellwand in einzelne Lamellen aufgeblättert. Vergr. 7500, auf 11250 nachvergr. (Aufnahme M. MIX)

Abb. 9. *Micrasterias rotata*. Schnitt durch die Zellwand am Grunde des Einschnittes zwischen 2 Lappen. Lamelläre Struktur. Vestopal-Einbettung. Vergr. 7500, auf 22500 nachvergr. (Aufnahme M. MIX)

Abb. 10. *Micrasterias rotata*. Netzartige Aufblätterung der Zellwand am Grunde des Sinus. Vestopal-Einbettung. Vergr. 7500, auf 11250 nachvergr. (Aufnahme M. MIX)





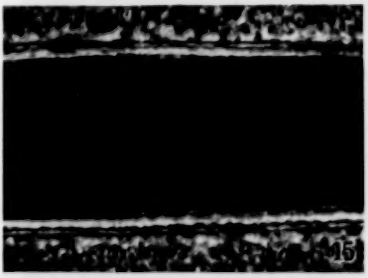


Abb. 11. *Closterium moniliferum.* Zellwand 5 Std mit 50%iger Chromsäure behandelt. Eine innere Schicht zeigt parallel zur Längsachse verlaufende Fibrillen (Fasertextur) und eine äußere, am Rand der Zellen als Saum überstehende Schicht senkrecht zur Längsachse orientierte Fibrillen (Ringtextur). Vergr. 7600

Abb. 12. Wie Abb. 11, Vergr. 15400

Abb. 13—16. Legenden nebenstehend

Da uns zunächst die submikroskopische Struktur der Zellwände nur im Zusammenhang mit dem Porensystem interessiert hat, haben die folgenden Angaben über den Feinbau nur orientierenden Charakter. Eine eingehende Besprechung der submikroskopischen Struktur ist mit der Beschreibung des Verhaltens der Zellwand bei der Zellteilung für eine spätere Mitteilung vorgesehen.

a) Micrasterias rotata, Euastrum oblongum, Cosmarium spec. Nach 5stündiger Behandlung der Zellen mit Eau de Javelle oder nach kürzerer Einwirkung von Perhydrol können elektronenmikroskopisch in den Zellwänden nur Poren erkannt werden (Abb. 1). Erst nach längerem Kochen in 6%iger HCl oder nach 16stündiger Einwirkung von Perhydrol bei 40° C sind auch Fibrillen angedeutet, die nach 16stündiger Behandlung mit 20%iger Chromsäure deutlicher hervortreten (Abb. 2). Entsprechend den Angaben von Lhotský (1949) für *Cosmarium* beträgt auch in unseren Aufnahmen die Porenweite 130—200 mμ. Eine völlige Entfernung der Inkrusten und damit ein klares Hervortreten der Fibrillenstruktur erhält man erst nach 16 Std Einwirkung von 30%iger Chromsäure. Wie aus Abb. 3 und 4 hervorgeht, sind die Fibrillen bei *Micrasterias* und *Cosmarium* zu einem Netzwerk angeordnet, ebenso ist es bei *Euastrum*.

Diese Totalpräparate lassen nicht erkennen, ob die Wand aus verschiedenen Schichten aufgebaut ist. Schnitte durch die Wand von *Micrasterias* haben bisher zum Teil (Abb. 5 und 6), entsprechend den Angaben von Chardard u. Rouiller, keine einwandfreien Anhaltspunkte für einen Aufbau aus zwei dickeren, verschieden strukturierten Schichten geliefert. Daneben haben wir aber auch Aufnahmen, die für eine Zweischichtigkeit im lichtmikroskopischen Bereich sprechen könnten (Abb. 7). Auf alle Fälle setzt sich aber die Zellwand in Übereinstimmung mit der Auffassung von Chardard u. Rouiller aus einzelnen submikroskopischen Lamellen zusammen, wobei sich die äußere und die innere Lamelle im elektronenmikroskopischen Bild dunkler abheben. Diese lamelläre Struktur kommt besonders klar nach Einbettung der Zellen in Vestopal heraus (Abb. 9). Für den Lamellenbau spricht auch die relativ leichte Spaltbarkeit der Wand (Abb. 8 und 10). Die lamelläre Struktur ist am häufigsten am Grund der Buchten zwischen zwei Lappen

Abb. 13. *Closterium moniliferum.* Zellwand 16 Std mit Perhydrol bei 50° C behandelt. In dem von der äußeren Zellwandschicht gebildeten „Saum" sind zwischen den Fibrillenbündeln die feineren, parallel zur Längsachse verlaufenden Vernetzungsfibrillen zu erkennen. Vergr. 15400

Abb. 14. *Closterium moniliferum.* 16 Std mit Perhydrol bei 50° C behandelt. Zellwand aus dem Mittelteil der Zelle mit feinen Vernetzungsfibrillen zwischen den derberen Fibrillenbündeln. Vergr. 15400

Abb. 15. *Pleurotaenium trabecula.* Deutliche Mehrschichtigkeit der Zellwand nach Quellung in einer 1,2 %igen $KMnO_4$-Lösung. Aufnahme mit Phasenkontrast. Vergr. 240, auf 600 nachvergr. (Aufnahme M. Mix)

Abb. 16. *Hyalotheca dissiliens.* Färbung der Porenapparate in der Zellwand mit Methylviolett. Vergr. 610, auf 1220 nachvergr. (Aufnahme M. Mix)

(Abb. 9) und am Sinus (Abb. 10) zu beobachten. Ähnlich der Zellwand vieler Rhodophyceen (MYERS u. PRESTON 1959) ist demnach auch die Membran der hier besprochenen Desmidiaceen aus zahlreichen Lamellen mit einem fibrillären Netzwerk, die in einer amorphen Substanz eingebettet liegen, aufgebaut. Zum Unterschied von den Rhodophyceen scheinen aber die Fibrillen nicht völlig regellos verteilt zu sein. Manche Aufnahmen deuten eine Anordnung der Fibrillen in einem Winkel zwischen 70 und 90° zueinander an. Doch soll hier noch nicht näher darauf eingegangen werden.

Unserer Meinung nach kann man aus dem Fehlen einer deutlichen Zweischichtigkeit der Zellwand im elektronenmikroskopischen Bild noch nicht auf deren Abwesenheit schließen (CHARDARD u. ROUILLER, vgl. S. 217). Es können z. B in zwei Zellwandschichten durchaus verschiedene Inkrusten vorliegen, die sich mikrochemisch im Lichtmikroskop fassen lassen, aber bei der benutzten elektronenmikroskopischen Präparationsmethode keinen auffälligen Kontrast zu geben brauchen. So können wir nach Quellung der Zellwand in einer 1,2%igen $KMnO_4$-Lösung z. B. bei *Pleurotaenium trabecula* deutlich eine Mehrschichtigkeit erkennen (Abb. 15) und damit die Angaben der älteren Autoren bestätigen. Hier müssen weitere lichtmikroskopische Untersuchungen zur Klärung einsetzen.

b) Closterium moniliferum. Nach Eau de Javelle-Behandlung sind auch bei dieser Art nur Poren zu erkennen. Die fibrilläre Struktur tritt am deutlichsten nach 5stündiger Einwirkung von 50%iger Chromsäure hervor. Gute Ergebnisse liefert auch eine 16stündige Behandlung mit Perhydrol bei 50° C. Zum Unterschied von *Micrasterias*, *Euastrum* und *Cosmarium* zeigt aber *Closterium* eine ausgesprochene Paralleltextur. Ferner lassen sich bereits in den Totalpräparaten im elektronenmikroskopischen Bild deutlich zwei Schichten unterscheiden. In der inneren, dem Plasma zugekehrten Schicht verlaufen die Fibrillen parallel zur Längsachse der Zelle; man könnte also von einer „Fasertextur" (FREY-WYSSLING 1959) sprechen. In der äußeren Schicht sind die Fibrillen dagegen mehr oder weniger senkrecht zur Längsachse orientiert, so daß eine „Ringtextur" vorliegt (Abb. 11 und 12). Am Zellrand bildet die äußere Schicht im elektronenmikroskopischen Bild einen überstehenden Saum (Abb. 11—13), der die Textur besonders klar erkennen läßt. Die senkrecht zur Längsachse verlaufenden Fibrillen bilden dichtere Bündel, die durch parallel zur Längsachse liegende, feinere Fibrillen miteinander vernetzt sind (Abb. 13). Diese Vernetzung tritt auch gut im Mittelteil der Zelle hervor (Abb. 14).

Das elektronenmikroskopische Bild, welches auch bei einigen anderen *Closterium*-Arten beobachtet werden konnte, bestätigt also den bereits lichtmikroskopisch erschlossenen, von den anderen Desmidiaceen abweichenden Zellwandbau der Gattung (LÜTKEMÜLLER 1902, VAN WISSELINGH 1912). Die noch strittigen Fragen der Zellwandstruktur und der Zellteilung bei *Closterium* sollen hier unberücksichtigt bleiben.

4. Mikroskopische und submikroskopische Struktur von Zellwand und Hüllgallerte bei *Hyalotheca dissiliens*

Die lichtmikroskopisch auf Gallertstrukturen am meisten untersuchte Desmidiacee ist die fadenbildende Art *Hyalotheca dissiliens*. Die Zellen besitzen eine dicke Hüllgallerte, die nach Färbung „mit Methylenblau, Methylviolett eine außerordentlich scharf hervortretende Stäbchenstruktur" annimmt. „Die Aufsicht zeigt nun aber, daß die Strukturelemente der Scheide nicht einfache Stäbchen sind, sondern daß dieselben die Form von vierseitigen umgekehrten Pyramiden haben, welche mit ihren Spitzen der Zellwand aufsitzen und allmählich sich gegen die Peripherie der Scheide verbreitern und mit den Basen der benachbarten Elemente zu einem regelmäßigen polygonalen Netze vereinigen" (Klebs 1886, S. 379). Hauptfleisch (1888) erkannte dann, daß diese pyramidenförmigen „Gallertprismen" von einem Porus ausgehen, und Lütkemüller (1902) bezeichnete auf Grund dieser Struktur die Hüllgallerte mit dem jetzt in der Literatur allgemein üblichen Begriff „Prismengallerte".

Bei *Hyalotheca* sind die Poren in Form eines Gürtels auf jeder Zellhälfte angeordnet (Abb. 17), so daß sich die Gallerthülle aus ringförmigen Abschnitten zusammensetzt, die ihrerseits wieder aus soviel Gallertpyramiden bestehen, wie jeder Porengürtel Poren besitzt. Die Grenzen dieser ringförmigen Abschnitte sind meist nach schwacher Färbung mit Methylviolett als senkrechte Linien in der Gallerthülle zu beiden Seiten eines Fadens zu erkennen (vgl. Abb. 18). Außerdem besitzen auch die Querwände der einzelnen Zellen Poren, wie es bereits Hauptfleisch festgestellt hat. Diese Poren werden bei dem Zerfall eines Fadens in seine einzelnen Zellen sichtbar (Abb. 22 und 23). Innerhalb des Fadens kann die Gallertabsonderung durch die Querwandporen nur minimal sein, da sonst die Zellen auseinandergedrückt werden müßten. Dies ändert sich aber, wenn bei einem Fadenzerfall eine Querwand zur Grenzwand eines Fadenendes wird. Jetzt scheiden die Querwandporen eine besondere Gallertkappe ab (Hauptfleisch 1888, S. 10), die die Gallerthülle an den Enden wieder abschließt (Abb. 25).

Ferner werden bei Benutzung des Phasenkontrastes und vor allem nach Färbung mit basischen Farbstoffen die von Klebs (1886) als „Stäbchen" beschriebenen Strukturen sichtbar (Abb. 19). Bei einem Zerfall des Fadens in die Einzelzellen kippen diese meist um, so daß jetzt im mikroskopischen Bild die „Stäbchen" strahlenartig die Zelle umgeben (Abb. 24). Diese „Stäbchen" sind nicht immer deutlich zu erkennen. Ferner können sie auch eine recht unterschiedliche Länge besitzen. Meist nimmt die Struktur nur den inneren Teil der Gallerthüllen ein (Schröder 1902).

Das Ausbleiben einer Färbung hat kaum etwas mit dem Nachlassen oder Aufhören einer Gallertproduktion „neben nekrotischen bzw. toten Zellen" zu tun, wie es

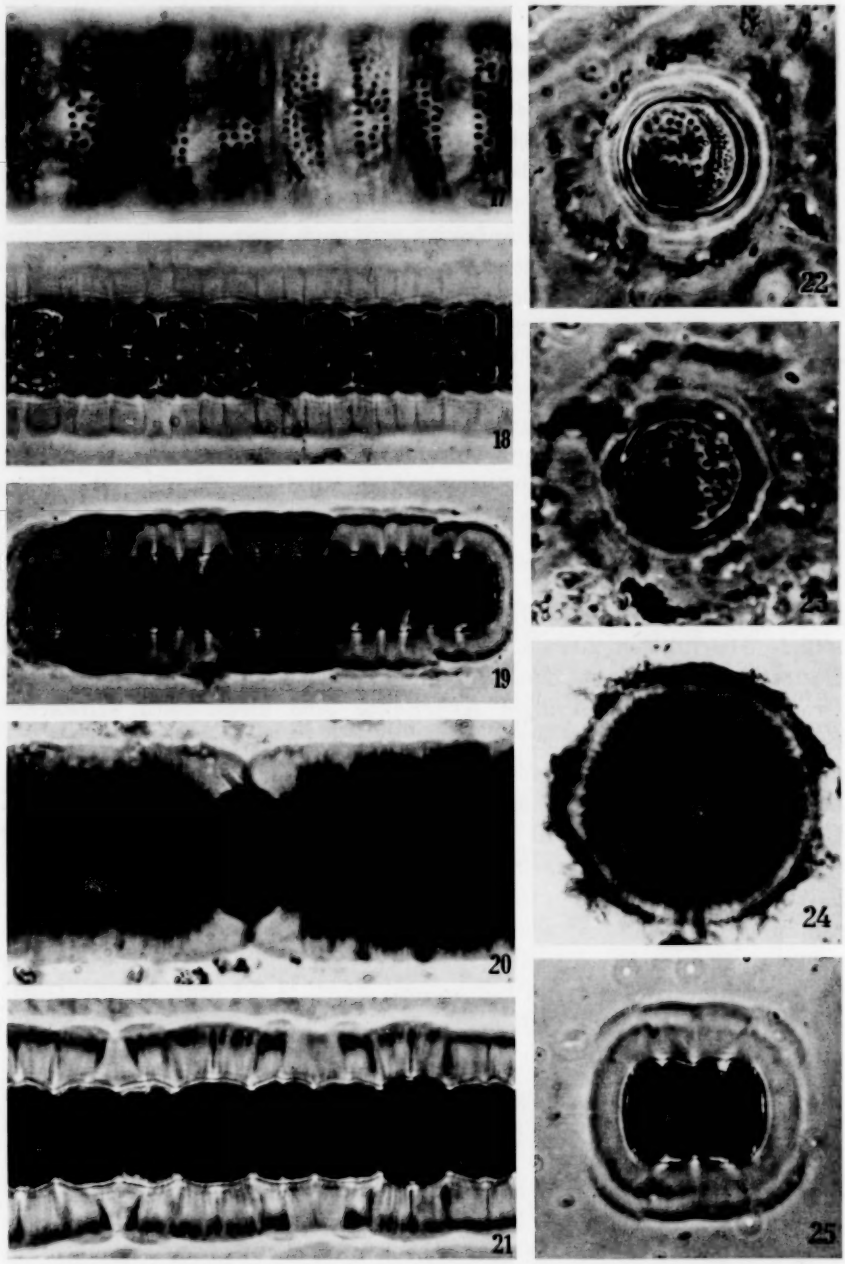


Abb. 17. *Hyalotheca dissiliens.* Porengürtel in der Außenwand nach elektiver Färbung der Gallertknöpfe auf den Poren mit Methylviolett. Vergr. 610, auf 1220 nachvergr. (Aufnahme M. MIX)

Abb. 18. *Hyalotheca dissiliens.* Schwache Färbung mit Methylviolett. In der Gallerthülle sind die Grenzen der von den Porengürteln ausgehenden, ringförmigen Abschnitte zu erkennen. Vergr. 213, auf 426 nachvergr.

Abb. 19—25. Legenden nebenstehend

KINZEL (1953, S. 27) anzunehmen scheint. Worauf die unterschiedliche Färbbarkeit der „Stäbchen" beruht (vgl. Abb. 19), können wir noch nicht sagen. Man muß berücksichtigen, daß durch die Teilungstätigkeit der Zellen in einem Faden sehr verschieden alte Zellhälften vorhanden sind. Bei der Bildung neuer Zellhälften werden die ringförmigen Gallertabschnitte der beiden alten Zellhälften auseinandergeschoben, der gegenseitige Druck läßt nach und die Gallertabschnitte wölben sich über die neuen Zellhälften, was eine stärkere Eindellung der Gallerthülle an dieser Stelle zur Folge hat. Die mehr oder weniger senkrecht stehenden „Stäbchen" erhalten eine Schräglage (Abb. 20 und 21). Durch die Produktion neuer Gallerte über den jungen Zellhälften werden die Gallerthüllen der älteren Zellhälften wieder auseinandergedrückt, die „Stäbchen" richten sich auf und die Eindellung verschwindet. Die zunächst gehegte Vermutung, daß die Intensität der Färbung vom Alter der Gallertabschnitte abhängt, scheint sich aber nicht immer zu bestätigen.

Die von KLEBS als „Stäbchen" bezeichneten Strukturen sind wohl, wie er bereits selber annimmt, die Grenzflächen der aneinanderstoßenden Gallertpyramiden oder -prismen. Außerdem können die Gallertprismen noch von Büscheln feiner, färbbarer Fädchen, die von den Porenenden ausgehen, durchsetzt sein (HAUPTFLEISCH).

LÜTKEMÜLLER versteht zum Unterschied von KLEBS unter „Stäbchen" eine färbbare, fadenförmige Struktur der äußeren Zellschicht. Daneben spricht er aber auch von „Gallertstäbchen".

Es wird angenommen, daß die Hüllgallerte durch die sogenannten „Porenorgane" bzw. „Porenapparate" (LÜTKEMÜLLER, SCHRÖDER) ausgeschieden wird. Diese Porenapparate sind am eingehendsten von LÜTKEMÜLLER untersucht und beschrieben worden. Danach bestehen sie aus einem „Porenfaden", der die Zellwand durchsetzt, an der Innengrenze der Zellwand mit einer linsenförmigen Anschwellung, der „Porenzwiebel", beginnt und an der äußeren Zellwandfläche mit einer knopfförmigen Erweiterung, dem „Endknöpfchen", endet. In der äußeren Zellwandschicht kann der Porenkanal, der durch den Porenfaden ausgefüllt ist, noch eine röhrenförmige Hülle, den „Porenmantel", besitzen.

Abb. 19. *Hyalotheca dissiliens.* „Stäbchenstruktur" der Hüllgallerte nach stärkerer Färbung mit Methylviolett. Aufnahme mit Phasenkontrast. Vergr. 150, auf 375 nachvergr. (Aufnahme M. MIX)

Abb. 20. *Hyalotheca dissiliens.* Einschiebung neuer Gallertabschnitte nach erfolgter Zellteilung. Stärkere Färbung mit Methylviolett. Vergr. 240, auf 480 nachvergr. (Aufnahme M. MIX)

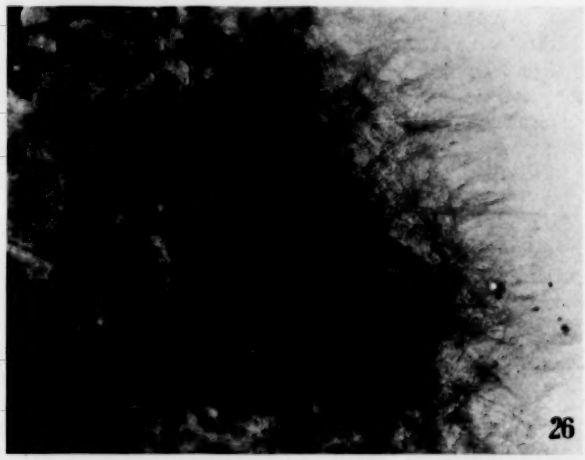
Abb. 21. Wie Abb. 20, aber schwache Färbung mit Methylviolett und Aufnahme im Phasenkontrast

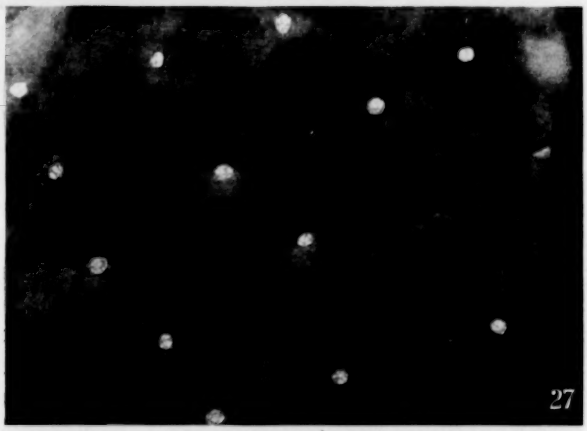
Abb. 22. *Hyalotheca dissiliens.* Tote Einzelzelle in Schrägansicht. Sowohl die Poren in der Außenwand als auch die der Querwand sind zu erkennen. Färbung mit Methylviolett. Aufnahme mit Phasenkontrast. Vergr. 240, auf 600 nachvergr. (Aufnahme M. MIX)

Abb. 23. *Hyalotheca dissiliens.* Tote Einzelzelle. Querwand mit Poren. Färbung mit Methylviolett. Aufnahme mit Phasenkontrast. Vergr. 240, auf 600 nachvergr. (Aufnahme M. MIX)

Abb. 24. *Hyalotheca dissiliens.* Einzelzelle in Aufsicht auf die Querwand mit „Stäbchenstruktur" in der Hüllgallerte. Stärkere Färbung mit Methylviolett. Vergr. 240, auf 600 nachvergr. (Aufnahme M. MIX)

Abb. 25. *Hyalotheca dissiliens.* Zwei Zellen mit geschlossener Gallerthülle. Schwache Färbung mit Methylviolett. Aufnahme mit Phasenkontrast. Vergr. 240, auf 480 nachvergr. (Aufnahme M. MIX)





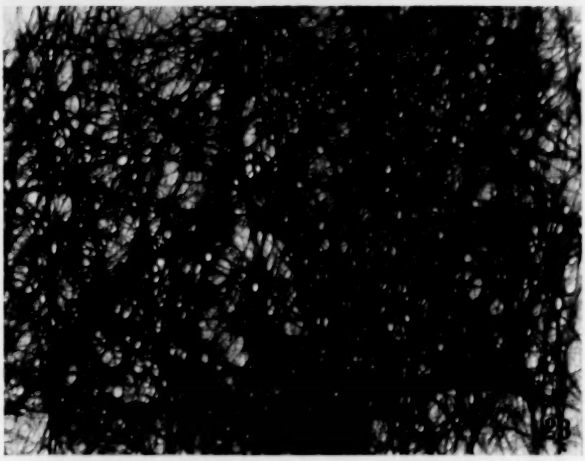


Abb. 26—28. Legenden nebenstehend

Diese Porenapparate geben keine Cellulosereaktion. Sie färben sich meist intensiv mit basischen Farbstoffen (Abb. 16, vgl. auch Abb. 17, 22 und 23). OLTMANNS (1922, S. 111) betont bereits mit Recht, daß es fraglich erscheinen muß, wieweit Färbungen die wahre Struktur der Porenapparate widerspiegeln, und CZURDA (1937, S. 22) hebt hervor, daß eine neuerliche Untersuchung mit anderen Methoden erfolgen sollte, da es sich um sehr schwer erkennbare und nicht immer gleich gut darstellbare Strukturen handelt. Es ist deshalb von besonderem Interesse zu untersuchen, wieweit sich die von LÜTKEMÜLLER angegebenen Strukturen elektronenmikroskopisch abbilden lassen. Inzwischen sind von CHARDARD u. ROUILLER (1957) zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen der Porenapparate von *Micrasterias papillifera* veröffentlicht worden.

Im elektronenmikroskopischen Bild sind nach 18 Std Behandlung mit Perhydrol bei 47°C in der Zellwand dunkle Gebilde zu erkennen (Abb. 26), die wohl den Porenapparaten LÜTKEMÜLLERs entsprechen dürften. Sie stecken in der Zellwand und füllen die Poren aus, die sie mit dem Endknöpfchen noch überwölben. Nach 24stündiger Einwirkung von 10%iger Chromsäure haben sich die Porenapparate aufgelöst, und die eigentlichen Zellwandporen werden abgebildet (Abb. 27). Die Poren besitzen, wie bei den anderen untersuchten Desmidiaceen, eine Weite von etwa 130 mμ. Nach 18 Std Behandlung mit 30%iger Chromsäure wird, wie bei *Micrasterias*, *Euastrum* und *Cosmarium*, eine fibrilläre Struktur der Zellwand sichtbar (Abb. 28).

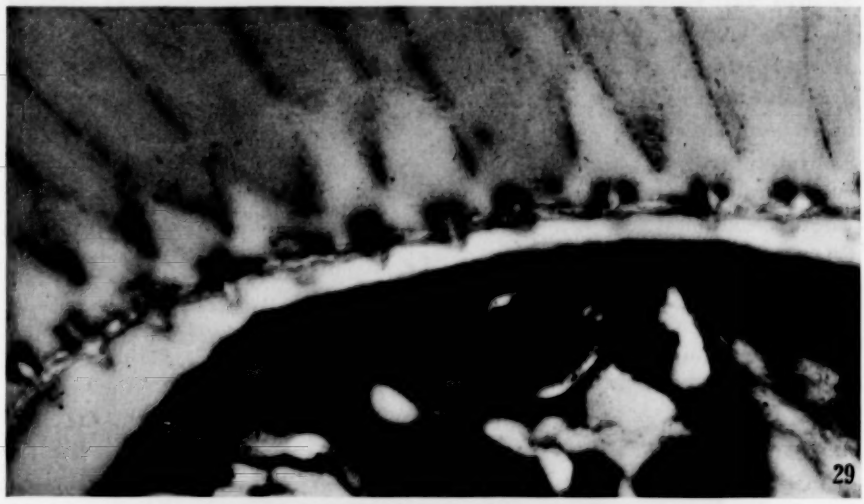
An Längs- und Querschnitten durch die Fäden von *Hyalotheca* lassen sich auch elektronenmikroskopisch die Stäbchenstruktur der Gallerte und die Porenapparate abbilden (Abb. 29 und 30). Die Aufnahmen zeigen, daß die Porenapparate keine kompakten, geschlossenen Gebilde darstellen, sondern von einem Porenkanal durchzogen werden. Aus Schrägschnitten geht hervor (Abb. 31 und 32), daß es sich bei den in der Gallerthülle erkennbaren „Stäbchen" um die Begrenzungsflächen der Gallertprismen handelt. In den Schrägschnitten sind auch einige Porenapparate getroffen, die einen Porenkanal deutlich erkennen lassen. Von den Porenapparaten gehen strahlige „Ausfaserungen" ab (Abb. 32), die sich unter Umständen auch weiter hinauf in die Gallertprismen erstrecken können. Auf alle Fälle zeigt das elektronenmikroskopische Bild, daß in den Zellwandporen noch ein sogenannter Porenapparat steckt, auf dessen Bau im einzelnen erst in der anschließenden

Abb. 26. *Hyalotheca dissiliens*. Zellwand nach 18 Std Behandlung mit Perhydrol bei 47° C. Die Porenapparate stecken noch in der Zellwand. Vergr. 7600

Abb. 27. *Hyalotheca dissiliens*. Zellwand nach 24 Std Behandlung mit 10%iger Chromsäure. Die Porenapparate sind aufgelöst und die Poren in der Zellwand zu erkennen. Vergr. 15400

Abb. 28. *Hyalotheca dissiliens*. Fibrilläre Struktur der Zellwand nach 18 Std Behandlung mit 30%iger Chromsäure. Vergr. 15400

Mitteilung an Hand der Verhältnisse bei *Micrasterias rotata* näher eingegangen werden soll.



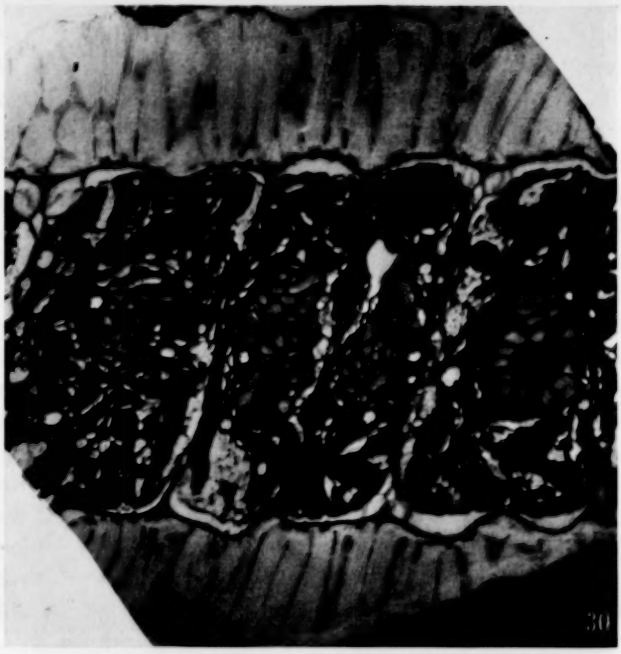
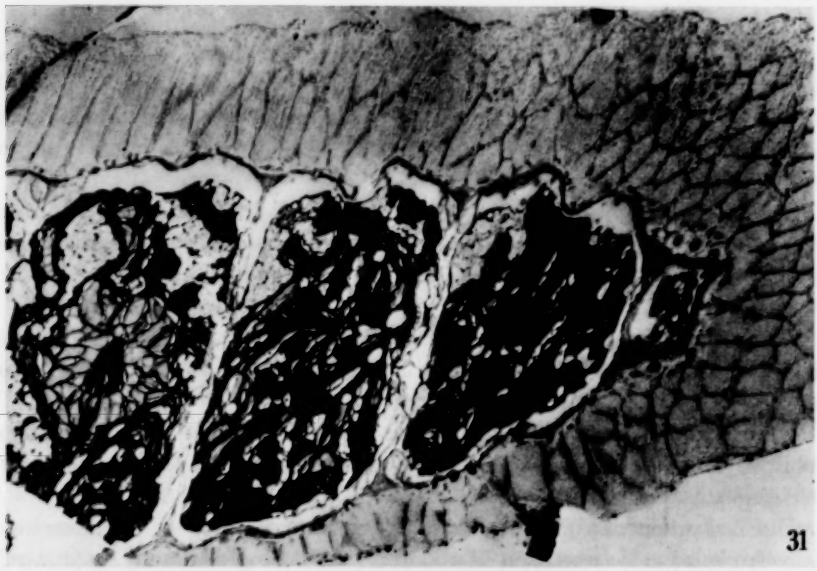


Abb. 29. *Hyalotheca dissiliens*. Querschnitt durch eine Zelle mit Porenapparaten in der Zellwand und „Stäbchenstruktur" in der Hüllgallerte. Vergr. 7600, auf 11400 nachvergr.

Abb. 30. *Hyalotheca dissiliens*. Längsschnitt durch einen Faden mit Porenapparaten in der Zellwand und „Stäbchenstruktur" in der Hüllgallerte. Elektronenmikroskopisches Übersichtsbild. Vergr. 1200, auf 1800 nachvergr.



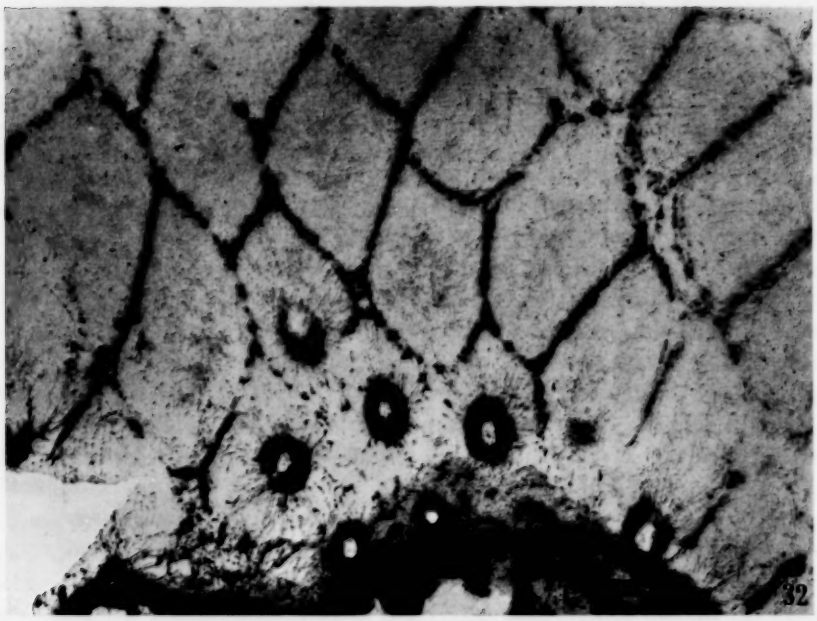


Abb. 31. *Hyalotheca dissiliens.* Schrägschnitt durch einen Faden. Begrenzungsflächen der Gallertprismen sind zu erkennen. Elektronenmikroskopisches Übersichtsbild. Vergr. 1200, auf 1800 nachvergr.

Abb. 32. *Hyalotheca dissiliens.* Querschnitt durch einige Porenapparate und durch die Gallertprismen der Hüllgallerte. Vergr. 7600, auf 11400 nachvergr. (Bereits veröffentlicht in SCHUSSNIG 1960, Abb. 878)

Zusammenfassung

Die Zellwände von *Micrasterias rotata*, *Euastrum oblongum*, *Cosmarium* spec. und *Hyalotheca dissiliens* besitzen zu einem Netzwerk angeordnete Fibrillen, die von *Closterium moniliferum* zeigen eine ausgesprochene Paralleltextur. Im Schnitt lassen die Zellwände einen lamellären Bau erkennen.

Bei *Closterium* können deutlich zwei Zellwandschichten unterschieden werden, eine innere mit vorwiegend parallel zur Längsachse orientierten Fibrillen und eine äußere, deren Fibrillen senkrecht zur Längsachse verlaufen.

Die Zellwände aller untersuchten Arten sind von Poren durchsetzt, die im elektronenmikroskopischen Bild eine Weite von 130—200 mμ aufweisen.

In den Poren steckt ein in der Literatur als Porenapparat bezeichnetes Gebilde, das für *Hyalotheca* elektronenmikroskopisch abgebildet wird und einen Porenkanal erkennen läßt.

Die Zusammensetzung der Hüllgallerte von *Hyalotheca* aus einzelnen Gallertprismen, die von den Poren ihren Ausgang nehmen, kann auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden.

Der größere Teil der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde in der Abteilung für Elektronenmikroskopie der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin gemacht, dessen Leiter, Herrn Professor Dr. Ernst Ruska, wir zu Dank verpflichtet sind. Ferner gilt unser Dank Fräulein Dr. Marianne Mix und Fräulein Dörthe Eckhardt für ihre Mitarbeit und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung unserer Arbeiten.

Das Literaturverzeichnis folgt am Schluß der II. Mitteilung, Bd. 56, S. 260 (1961).

Prof. Dr. H. Drawert,
Botanisches Institut der Universität, Marburg a. d. Lahn, Pilgrimstein 4

Planta 56, 229—232 (1961)

Kurze Mitteilung

RIBOSENUCLEINSÄURE UND BLÜHINDUKTION

Von

DIETER HESS

(Eingegangen am 2. November 1960)

Untersuchungen über die Physiologie der Blütenbildung von *Streptocarpus wendlandii* lieferten erste Anhaltspunkte für ein Zusammenspiel von RNS-Systemen verschiedener Funktion bei der Blühinduktion. Die wichtigsten Versuchsergebnisse und ihre Interpretation seien hier kurz mitgeteilt.

a) Stecklinge aus induzierten Pflanzen (zur Induktion vgl. OEHLKERS 1956) wurden mit Ribonuclease behandelt. Die Regeneration von Blättern und Blüten (vgl. OEHLKERS 1956) war bei behandelten Stecklingen gegenüber Kontrollen stark verzögert. Wie Versuche mit Eieralbumin und inaktivierter Ribonuclease zeigten, ist diese Verzögerung kein unspezifischer Eiweißeffekt, sondern beruht auf den fermentativen Eigenschaften der Ribonuclease. Eine generelle Beteiligung von RNS an Blatt- und Blütenbildung war damit erwiesen, wenn auch bei der gegebenen Versuchsanordnung keine Aussagen über eine eventuelle Spezifität der an der Blütenbildung beteiligten RNS gemacht werden konnten.

b) Nach einer abgewandelten Phenolmethode (GIERER und SCHRAMM 1956) wurden RNS-haltige Präparate aus vegetativen und induzierten Pflanzen gewonnen und miteinander verglichen. Der Quotient Guanin/Adenin ist in der RNS induzierter Pflanzen gesichert höher als in derjenigen vegetativer. Da die induzierten Pflanzen bereits bis zu 10 cm hohe Inflorescenzen besaßen, dürfte diese Veränderung sekundärer Natur sein. Daß die reproduktive Phase demnach durch eine andere RNS gekennzeichnet wird als die vegetative, bedeutet keinesfalls einen Beweis für die Beteiligung spezifischer RNS auch an der vorhergehenden Blühinduktion, läßt sie aber als durchaus möglich erscheinen.

c) Bei *S. wendlandii* laufen nach der Blühinduktion zwei Prozesse ab: 1. ein starkes vegetatives Wachstum des Blattes und 2. die Ausbildung der Inflorescenzen an der Basis des Blattes. Durch Behandlungen mit 2-Thiouracil während der Induktion konnte die Inflorescenzbildung selektiv — ohne Beeinträchtigung des Wachstums — blockiert oder verzögert werden. Die im einzelnen bereits mitgeteilten Befunde lassen den Schluß zu, daß durch Thiouracil lediglich ein spezifisch an der Blühinduktion beteiligtes RNS-System außer Funktion gesetzt wird (HESS 1959).

d) Durch Applikation von Äthionin während der Induktion läßt sich die Blütenbildung ebenso selektiv stören wie mit Thiouracil. Für Äthionin als Antagonisten des Methionins kommen dabei mehrere Wirkungsweisen in Betracht (BOLL 1960). Eine Blockierung zentraler Stoffwechselmechanismen, etwa der Transmethylierungsreaktionen, erscheint wenig wahrscheinlich, weil in diesem Fall auch das Wachstum hätte beeinträchtigt werden müssen. Mit Hilfe radioaktiv markierter Substanz war es nun möglich, einen Einbau von Äthionin in die Proteine von *Streptocarpus* nachzuweisen. Der Wirkungsmechanismus des Äthionins könnte infolgedessen in der Blockierung eines spezifisch an der Blütenbildung beteiligten Proteins gesehen werden. Die Existenz eines spezifischen Proteins läßt aber — nach den bisher vorliegenden Untersuchungen auch bei höheren Pflanzen (vgl. BRACHET 1957, WEBSTER 1958) — Rückschlüsse auf das Vorhandensein eines ebenso spezifischen RNS-Systems zu.

Berücksichtigt man noch weitere Versuchsergebnisse, die ebenfalls eine Beteiligung zwar nicht von RNS speziell, aber von Nucleinsäuren überhaupt an der Blühinduktion wahrscheinlich machen (SALISBURY und BONNER 1960), so liegen starke Indizien für die Bildung eines spezifisch blühfördernden RNS-Systems während der Induktion vor. Angesichts der vielseitigen Korrelationen in lebenden Organismen entsteht damit unter anderem die Frage nach dem Verhältnis dieser neugebildeten „reproduktiven" RNS zu den in der Zelle bereits vorhandenen, „vegetativ" tätigen RNS-Systemen. Folgende Daten geben erste Aufschlüsse:

e) *S. wendlandii* wächst während der Induktion nicht, obwohl Pflanzen unter induktiven Bedingungen mehr DNS, RNS und Protein enthalten können als die entsprechenden Kontrollen unter nicht induktiven Bedingungen. Diese Kontrollen dagegen wachsen trotz des geringeren Gehaltes an den erwähnten Substanzen. Es fragte sich, ob die „vegetative" RNS unter induktiven Bedingungen zwar nach wie vor vorhanden, aber in ihrer Aktivität herabgesetzt sein könnte.

f) Während der Induktion sinkt bei *S. wendlandii* der Wuchsstoffgehalt vorübergehend stark ab (HESS 1958). Dennoch sind die Wuchsstoffe nicht die das Wachstum begrenzenden Faktoren, denn auch durch Applikation verschiedener Konzentrationen an Indol-3-essigsäure und Gibberellinsäure konnte kein Wachstum während der Induktion ausgelöst werden.

g) Von einigen überprüften Stämmen des Tabakmosaikvirus zeigt nur „flavum" sichtbare Symptome auf *Streptocarpus*. Eine Virusvermehrung findet dabei nur unter nichtinduktiven Bedingungen statt, während der Induktion dagegen unterbleibt sie. Inoculiert man unter

induktiven Bedingungen, so erscheinen die Symptome (runde gelbe Flecke) erst nach Abschluß der Induktion und zwar dem Zeitpunkt ihres Auftretens, ihrer Zahl und Größe nach derart, als hätte man am Induktionsende selbst und nicht schon früher infiziert. Die Virussusceptibilität der Zellen wird während der Induktion nicht verändert; eine latente Virusvermehrung ließ sich ebenfalls ausschließen. Die Versuche zeigen, daß unter induktiven Bedingungen Systeme, in denen RNS eine tragende Rolle spielt, vorübergehend stillgelegt werden können.

h) Die Aufnahme von radioaktivem Phosphat in die RNS ist unter induktiven Bedingungen geringer als unter nichtinduktiven, d. h. die metabolische Aktivität der RNS ist während der Induktion herabgesetzt. Untersuchungen über die Wirkung von Wuchsstoffen auf die Phosphataufnahme in die RNS brachten unter anderem als Ergebnis, daß Gibberellinsäure unter nichtinduktiven Bedingungen die metabolische Aktivität der RNS erhöht. Unter induktiven Bedingungen dagegen bewirkt Gibberellinsäure eine zusätzliche Aktivitätsminderung.

e—h erlauben den Schluß, daß während der Induktion die „vegetativen" RNS-Systeme, die die quantitativ überwiegende Menge der in den Zellen vorhandenen RNS ausmachen, sistiert werden. Unter diesen Voraussetzungen bildet sich dann offensichtlich ein „reproduktives" RNS-System.

Die experimentellen Daten gestatten es, für *Streptocarpus* eine Hypothese der Blütenbildung zu formulieren, die sowohl den Grundforderungen der Blühhormonhypothese als auch denjenigen der Blühhemmtheorie nachkommt: Das im Sinne der Blühhormontheorie spezifisch fördernde „reproduktive" RNS-System kann erst dann voll ausgebildet werden, wenn das konkurrierende „vegetative" RNS-System unter induktiven Bedingungen der Blühhemmtheorie entsprechend ausgeschaltet wird. Neben anderen Faktoren scheint sich ein Wechselspiel von RNS-Systemen verschiedener morphogenetischer Potenz entscheidend an der Blühinduktion zu beteiligen.

Eine eingehende Darstellung dieser und weiterer Versuchsergebnisse sowie der Methodik erfolgt an anderer Stelle.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. F. Oehlkers möchte ich für die Förderung der vorliegenden Arbeit danken.

Literatur

Boll, W. G.: Ethionine inhibition and morphogenesis of excised tomato roots. Plant Physiol. **35**, 115—122 (1960).

Brachet, J.: Biochemical cytology. New York: Academic Press 1957.

Gierer, A., u. G. Schramm: Die Infektiosität der Nucleinsäure aus Tabakmosaikvirus. Z. Naturforsch. **11**b, 138—142 (1956).

HESS, D.: Die Regulatoren des Streckungswachstums bei *Streptocarpus wendlandii* Utrecht und ihre Veränderungen während der Blühinduktion. Planta (Berl.) **50**, 504—525 (1958).

— Die selektive Blockierung eines an der Blühinduktion beteiligten Ribosenucleinsäure-Eiweiß-Systems durch 2-Thiouracil. Planta (Berl.) **54**, 74—94 (1959).

OEHLKERS, F.: Veränderungen in der Blühbereitschaft vernalisierter Cotyledonen von *Streptocarpus*, kenntlich gemacht durch Blattstecklinge. Z. Naturforsch. **11b**, 471—480 (1956).

SALISBURY, F. B., and J. BONNER: Inhibition of photoperiodic induction by 5-fluorouracil. Plant Physiol. **35**, 173—177 (1960).

WEBSTER, G. C.: Nitrogen metabolism in plants. New York: Row, Peterson & Co. 1958.

Dr. DIETER HESS,
Botanisches Institut der Universität, Freiburg i. Br., Schänzlestr. 9—11

Planta 56, 233—236 (1961)

Kurze Mitteilung

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

ÜBER DAS ZUSAMMENWIRKEN VERSCHIEDENER FAKTOREN BEI DER ANTHOCYANENTFÄRBUNG VON BEGONIEN

Von

HANS-LUDWIG JÜRGENSMEIER

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 5. November 1960)

Der Nachweis eines Fermentes und seines Substrates in einer Pflanze berechtigt noch nicht ohne weiteres zu der Annahme, daß die dadurch mögliche Reaktion auch an spezifischer Stelle im Stoffwechsel eine Rolle spielt. Bei keiner Pflanze ist deshalb bisher etwas über die Abbauwege des Anthocyans während seines Verschwindens bekannt, denn überzeugende Beweise für die Steuerung dieses Prozesses in vivo durch bisher beschriebene Enzyme (HUANG 1955, BAYER und WEGMANN 1957, BOPP 1957, JÜRGENSMEIER und BOPP 1961) fehlen. Histochemische Nachweise der Lokalisation derartiger Fermente und ihrer Substrate in der Zelle sind aus anatomisch-physiologischen Gründen nicht durchführbar. Es wurde darum versucht, den aktuellen Anthocyangehalt in der Pflanze der Aktivität der in vitro am Abbau beteiligten Enzyme gegenüberzustellen. Wenn das an anderer Stelle beschriebene Oxalsäureoxydase-Peroxydase-System (JÜRGENSMEIER und BOPP 1961) für den Abbau in vivo verantwortlich ist, so muß eine Korrelation zwischen der Anthocyanmenge und der Aktivität jener Enzyme z. B. in verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanze bestehen.

Die Umsatzgeschwindigkeit des bei Begonien gefundenen anthocyanentfärbenden Systems wird durch die Oxalsäureoxydase bestimmt. Der Vergleich kann sich daher auf dieses Ferment beschränken. Er ergab auch über längere Zeit für die Altersblätter des Bastards *Begonia dregei* × *B. natalensis* eine deutliche Abhängigkeit beider Größen voneinander und zwar bilden die Pflanzen dann, wenn die Oxalsäureoxydase in niedriger Aktivität vorliegt, bei günstigen Lichtbedingungen sehr viel leichter Anthocyan aus. Die Abbildung zeigt die Korrelation, die zwischen Anthocyanzu- und -abnahme in den Blättern und der Fermentmenge in den Knollen besteht. Die Knollen wurden deshalb gewählt, weil sich in den Blättern das Ferment nicht quantitativ erfassen läßt. Anstieg und Abfall der Aktivität in den Blättern und Knollen laufen jedoch parallel.

Im einzelnen ergibt sich aus dem Kurvenverlauf folgendes: Von Mitte September 1958 ab kann bei den Pflanzen, die sich in einem Warmbeet befanden, eine Abnahme der Fermentaktivität und eine leichte Zunahme der Anthocyanmenge konstatiert werden (Abb. 1a, b). Zwei Versuchsserien sind in den Abbildungen dargestellt. Die Pflanzen der ersten (Abb. 1a) standen ab Mitte Oktober im Gewächshaus, die der zweiten in einer Klimakammer bei 25°C, 16^h-Tag, die mit HNW 202- und HNI de Luxe-Leuchtstoffröhren bestückt war und eine Gesamtlichtintensität von 3500 Lux hatte. Für die Serien im Gewächshaus liegt die Lichtintensität von Dezember an unter dem für die Anthocyanbildung notwendigen Minimum ($\sim$ 1500 Lux), so daß die Mittelwerte der Anthocyanbestimmung keine signifikante Differenz mehr zeigen; der geringe Fermentgehalt findet deshalb keinen Ausdruck in einer erhöhten Anthocyanbildung (vgl. hierzu BOPP 1957).

Eindeutigere Beziehungen ergeben sich dagegen aus den Klimakammerversuchen: Pflanzen, die ihrem Entwicklungszustand entsprechend im Sonnenlicht grüne Altersblätter mit nur geringer Anthocyanmenge bilden würden, legen hier zunächst anthocyanreiche Jugendblätter an, d. h. der Anthocyangehalt nimmt mit Beginn der Kunstlichtbehandlung zu. Diesem auffälligen Übergang entspricht ein deutlicher Abfall der Fermentaktivität, der bereits vor der Klimakammerbehandlung einsetzte und zunächst ziemlich stark anhält. Von der dritten bis vierten Woche nach Beginn der Lichtbehandlung aber nimmt die Aktivität wieder zu und zwar besonders intensiv, wenn man (wie in dem hier dargestellten Versuch) den HNI de Luxe-Röhren die gleiche Anzahl HNW-Röhren beimischt. Letztere sind anscheinend wichtig für die Aufrechterhaltung der Eiweißsynthese. Unter reinem HNI de Luxe-Licht steigt die Aktivität des Ferments langsam jedoch ebenfalls deutlich meßbar an. Entsprechend dieser Aktivitätszunahme ab Ende November bleibt die Anthocyanmenge entweder auf gleichem Niveau oder nimmt sogar ab (Abb. 1b; der geringe Abfall ist nicht gesichert, $P = 0{,}2$ bis $0{,}3$).

Wir können also festhalten, daß in jedem Falle, besonders deutlich unter der Wirkung des HNI de Luxe-Lichtes, ein Zusammenhang zwischen Fermentaktivität und Anthocyanumsatz zu erkennen ist. Wenn diese Korrelation bisher nicht durch einen Koeffizienten gekennzeichnet werden kann, so liegt das daran, daß das Licht wahrscheinlich weitere Faktoren des Anthocyanumsatzes beeinflußt, z. B. werden die Pflanzen auch morphologisch deutlich verändert. Der relativ hohe Rotanteil (um 660 mμ) des Lichtes der verwendeten HNI de Luxe Röhren kann nicht nur *direkt* für die erhöhte Anthocyanbildung verantwortlich sein (SIEGELMANN und HENDRICKS 1957, 1958a, b; MOHR 1957), sondern auch über die ebenfalls wellenlängenabhängige Ascorbinsäuresynthese (RUGE 1957) einen Abbauschutz bedingen (vgl. JÜRGENSMEIER und

Bopp 1961). Die Ascorbinsäure würde dann — erst am fertigen Anthocyanmolekül eingreifend — durch ihr Reduktionspotential die Anthocyanmenge bestimmen, die vor der Wirkung der Oxydase geschützt, in die Vacuole abgelagert werden kann. Möglicherweise beeinflußt Ascorbinsäure aber auch schon die Oxydation von Anthocyanvorstufen, wie Kandeler (1958) vermutet. Weitere Versuche müssen den Angriffspunkt der Ascorbinsäure genauer festlegen. Eine Korrelation zwischen

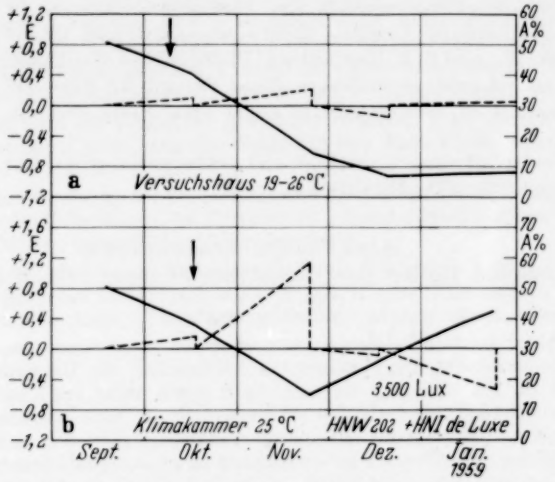


Abb. 1. Anthocyanmenge und Oxalsäureoxydase-Aktivität bei *Begonia dregei* × *B. natalensis*. Die Pfeile bezeichnen den Zeitpunkt, zu dem die Pflanzen in die angegebenen Bedingungen kamen. Ordinate, linke Seite (E): Steigerung (+) bzw. Verminderung (—) der Anthocyanmenge seit der letzten Bestimmung (gestrichelte Linie). Angabe in Extinktionswerten (1 g Blätter in 40 ml 1 n HCl bei 520 mμ, 1 cm Schichtdicke). Ordinate, rechte Seite (A): Aktivität der Oxalsäureoxydase in Prozent der Entfärbung einer Standardlösung mit einer bestimmten Fermentmenge (ausgezogene Linie). Abszisse: Daten der Bestimmungstage

Ascorbinsäuremenge und Anthocyanbildung liegt schon deshalb nahe, weil ein Ascorbinsäurenachweis immer nur dann möglich war, wenn Begonien reichlich Anthocyan in ihren Blattspreiten besaßen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß diese Versuche einen Hinweis dafür liefern, daß das in vitro nachgewiesene System der Anthocyanentfärbung auch in vivo aktiv sein und den Ausfärbungszustand der Pflanzen beeinflussen kann.

Eine ausführliche Darstellung der Methoden und Ergebnisse bleibt einer späteren Veröffentlichung vorbehalten.

Literatur

Bayer, E., u. K. Wegmann: Enzymatischer Abbau von Anthocyanen. Z. Naturforsch. **12**b, 37—40 (1957).

Bopp, M.: Untersuchungen über die Verteilung und Vererbung von Anthocyan in den Blättern von Begonien. Planta (Berl.) **48**, 631—682 (1957).

Huang, H. T.: Decoloration of anthocyanins by fungal enzym. J. agric. Food-Chemistry **3**, 141—146 (1955).

Jürgensmeier, H. L., u. M. Bopp: Enzymatischer Anthocyanabbau bei Begonien. Naturwissenschaften (1961, im Druck).

Kandeler, R.: Über die Lichtabhängigkeit der Anthocyanbildung. Ber. dtsch. bot. Ges. **71**, 24—25 (1958).

Mohr, H.: Der Einfluß monochromatischer Strahlung auf das Längswachstum der Hypocotyle und auf die Anthocyanbildung bei Keimlingen von *Sinapis alba* L. (= *Brassica alba* Boiss). Planta (Berl.) **49**, 389—405 (1957).

Ruge, U.: Der Ascorbinsäuregehalt von *Tradescantia*-Blättern in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichtes. Naturwissenschaften **44**, 13—14 (1957).

Siegelmann, H. W., and S. B. Hendricks: Photocontrol of anthocyanin formation in turnip and red cabbage seedlings. Plant Physiol. **32**, 393—398 (1957).

— — Photocontrol of anthocyanin in apple skin. Plant Physiol. **33**, 185—190 (1958a).

— — Photocontrol of alcohol, aldehyd, and anthocyanin production in apple skin. Plant Physiol. **33**, 409—413 (1958b).

Hans-Ludwig Jürgensmeier,
Botanisches Institut der Universität, Freiburg i. Br., Schänzlestr. 9

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigung bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Vorläufige Mitteilungen werden nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellungen der Tatbestände ist zulässig.

II. Formelle Anforderungen

Originalarbeiten sollen nicht umfangreicher als zwei Druckbogen (à 16 Druckseiten) sein; Kurze Mitteilungen dürfen den Umfang von vier Druckseiten nicht überschreiten.

Das Manuskript muß leicht leserlich und einseitig geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern einzureichen, ebenso die Legenden. Die Arbeiten müssen knapp und sprachlich klar geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. *Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen* (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) *herzustellen.*

Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

Für die Rechtschreibung ist die „wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt.

Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in Deutsch oder Englisch oder Französisch nach freier Wahl des Autors abgefaßt sein kann. Inhaltsverzeichnisse können nicht abgedruckt werden.

Von jeder Versuchsart bzw. von jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text, oder wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber zu umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen durch eine Fußnote darauf hinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen und angefordert werden kann.

Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige zu beschränken. Knappe Abbildungsunterschriften erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Unzulässig ist die doppelte Darstellung in Tabelle *und* Kurve. Für Halbtonbilder (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind reproduktionsfähige, d.h. scharfe, gut durchgezeichnete und tonwertreiche Vorlagen (Hochglanzabzüge) einzureichen. Die Beschriftung der Abbildungen mit Buchstaben und/oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise sind auf einem über die Vorlage geklebten Deckblatt einzureichen. Für schematische Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzungen reproduziert werden sollen, sind saubere, klare Skizzen abzuliefern, die vom Verlag umgezeichnet werden.

Literaturangaben, die nur im Text berücksichtigte Arbeiten enthalten dürfen, erfolgen mit vollständigem Titel der Arbeit, Zeitschriftentitel (in der Abkürzung nach den World Medical Periodicals), Band-, Seiten- und Jahreszahl. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen (jeweils mit Anfangsbuchstaben des Vornamens) *alphabetisch* anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammer gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

Die Beschreibung von Methodik, Protokollen und weniger wichtigen Teilen ist für Kleindruck vorzumerken. Autorennamen sollen (für KAPITÄLCHEN-Druck) doppelt, lateinische Namen der Objekte (für *Kursiv*-Druck) geschlängelt unterstrichen werden. In Kursiv-Druck können auch andere Worte des Textes gesetzt werden, die der Autor besonders hervorzuheben wünscht.

Das Zerlegen der Arbeit in mehrere Mitteilungen, um sie kürzer erscheinen zu lassen, ist unzulässig.

Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel nicht die gleichen sind.

Danksagungen können in Form von Fußnoten zum Beitragstitel oder als kurzer Petitabschnitt am Schluß der Arbeit gebracht werden. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

In der Korrektur sollen nur Druckfehler verbessert, jedoch keine inhaltlichen oder stilistischen Änderungen vorgenommen werden. 10% der Satzkosten übersteigende Korrekturkosten müssen den Autoren in Rechnung gestellt werden.

Ergebnisse der Biologie

Herausgegeben von H. Autrum · E. Bünning · K. v. Frisch · E. Hadorn
A. Kühn · E. Mayr · A. Pirson · J. Straub · H. Stubbe · W. Weidel

Redigiert von Hansjochem Autrum

Vor kurzem erschien:

Dreiundzwanzigster Band

Mit 40 Abbildungen. IV, 221 Seiten Gr.-8°. 1960. DM 48,—
(5 Beiträge in deutscher und 2 Beiträge in englischer Sprache)

INHALTSVERZEICHNIS

The Pollen and Pollen Tube. By B. M. Johri and I. K. Vasil, Delhi (India) · Vergleichende Biochemie der Phenylpropane. Von H. Reznik, Heidelberg · Photomorphogenetische Reaktionssysteme in Pflanzen. 2. Teil: Der Einfluß kurzwelligen Lichts auf Wachstum und Entwicklung. Von H. Mohr, Tübingen · Homing Orientation in Migrating Fishes. By A. D. Hasler, Madison/Wis. (USA) · Beziehungen zwischen Entomophagen und ihrer Beute als Grundlage der biologischen Schädlingskontrolle. Von R. Lange, Freiburg i. Br. · Die Biologie der kondensierten anorganischen Phosphate. Von A. Kuhl, Göttingen · Über die Rolle der Frequenzgruppe beim Hören. Von E. Zwicker, Stuttgart · Namen- und Sachverzeichnis.

Früher erschien:

Zweiundzwanzigster Band

Mit 55 Abbildungen. IV, 289 Seiten Gr.-8°. 1960. DM 30,—
(5 Beiträge in deutscher und 3 Beiträge in englischer Sprache)

INHALTSVERZEICHNIS

Comparative aspects of hypothalamic-hypophysial relationships. By C. Barker Jørgensen and Lis Olesen Larsen, Copenhagen (Denmark) · Der Stoffwechsel der Trypanosomen. Von Theodor von Brand, Bethesda (USA) · Centrifugal mechanisms of sensory control. By Karl-Erik Hagbarth, Uppsala (Sweden) · Photomorphogenetische Reaktionssysteme in Pflanzen. 1. Teil: Das reversible Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystem und das Blau-Dunkelrot-Reaktionssystem. Von Hans Mohr, Tübingen · Die Bitterstoffe der Cucurbitaceen. Von Sigmund Rehm, Pretoria (Südafrikanische Union) · Die cytologischen und genetischen Konsequenzen von Inversionen. Von Reinhard Panitz, Gatersleben · Pheromones. By Peter Karlson, München · Die Eigenschaften und Funktionstypen der Sinnesorgane. Von Dietrich Burkhardt, München · Namen- und Sachverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany